د. عبد الحسين الفيصل

التقنيّات المعمليّة في الهندسة الوراثيّة



د. عبدالحسين الفيصل

التقنيات المعملية في الهندسة الوراثية



الأهليّة للنشر والتوزيع

المملكة الأردنيّة الهاشميّة ، عمّان
وسط البلد ، خلف مطعم القدس
هاتف ٤٦٣٨٦٨٨ ، فاكس ٤٦٥٧٤٤٥
ص. ب : ٧٧٧٢ عمّان / الأردن

التقنيّات المعمليّة
في الهندسة الوراثيّة

د. عبد الحسين الفيصل / العراق

الطبعة العربيّة الأولى ، ١٩٩٩

تصميم الغلاف : **زهير أبو شايب** / الأردن

الصفّ الضوئي : **ياقوت ، عمّان ، هاتف ٤٦٤١١٨٣**

د. عبد الحسين الفيصل

التقنيّات المعمليّة في الهندسة الوراثيّة

Laboratory Techniques In Genetic Engineering

الأهلية

بسم الله الرحمن الرحيم

﴿ وما أوتيتم من العلمِ إلا قليلا ﴾

(صدق الله العظيم)

الــى مَــنْ أنــــارَ القَلــــبْ

والـــــدَرْبْ

وكـــانَ فَنَــــــارَ العِـــــــلمَ

والأدَبْ

الـــى والــــــدي أعـــزهُ الله

وأمـــــدَ فــــي عمــــــرِهِ

مقدمــة الكتـاب

لقد تطور علم الوراثة بشكل هائل سبق في ذلك معظم فروع علوم الحياة . ولا شك بأن الهندسة الوراثيـة وتقنيـاتها المتطورة شكلتا ثورة بارزة تركت آثاراً واضحة على القرن العشرين . فقد تقدمت الزراعة بالوراثة ووفرت القوانين الوراثية الأساس العملي لإنتقاء الأصناف والسلالات النباتية الأكثر غزارة في الإنتاج والأفضل في المحتوى وهو ما دفع بالزراعة قدماً نحو الأمام حتى أصبح الانتاج الزراعي هائلاً وضخماً أينما طبقت فيه التقنيات العلمية (والالية طبعاً) في الانتاج والتخزين .

أما في المجال الصناعي فيكفي أن نقول بأن البايوتكنولوجي أصبح الركن الأساس في الانتاج الصناعي الطبي عبر استخدام تقنيات الهندسة الوراثية لانتاج الالاف من العقاقير الطبية والادوية والامصال وغيرها . هذا اضافة لخلق نوع جديد من الاعمال الا وهو توفير الادوات والمواد اللازمة لعمل البايوتكنولوجي والهندسة الوراثية . ويحفل العالم يومياً بأخبار نتائج أبحاث الهندسة الوراثية بحيث أصبح لزاماً علينا أن نولج معارف هذا العالم في مقرراتنا الدراسية وأن نوفر الامكانات النظرية والعملية لتحقيق ما يمكن الاستفادة منه في هذا الفرع الهام .

ونظراً للأهمية الكبيرة هذه وضع هذا الكتاب ليوفر الطرق العملية للقيام بالتجارب العلمية والعملية في المختبرات الجامعية والصناعية وهو مناسب تماماً لطلبة الاحياء والزراعة والصيدلة لما فيه من طرق تخدم الاساس العملي لمادة الوراثة الجزيئية والهندسة الوراثية والبايولوجيا الجزيئية .

وفي الختـــام . . .

أتمنى بأن أكون قد وفقت من خلال هذا الجهد المتواضع في إنارة شمعة بسيطة حول أحد أهم حقول المعرفة البايولوجية .

ومـــن الله التـــوفيق .

د . عبد الحسين مويت الفيصل

عمـــان - المملكة الأردنية الهاشمية

١٩٩٩/١/١

محتويات الكتاب

الموضـــــوع	الصفحة

الموضــــــوع	الصفحة

الموضـــــوع	الصفحة

الموضـــــوع	الصفحة

الموضوع	الصفحة

الفصل الأول

« زراعة الخلايا لأغراض إستخلاص الأحماض النووية »

Cultures and Tissue Culture for Nucleic Acids Extraction

مواد عامة لازمة للعمل

1 - الأوساط الغذائية :

: LB agar

10 غرام Bacto-tryptone

5 غرام Bacto-yeast extrct

10 غرام Nacl

15 غرام Bacto-agar

+ لتر ماء مقطر PH 7.2 - تعقيم

: Top LB agar

10 غرام Bacto-tryptone

5 غرام Bacto-yeast extrct

10 غرام Nacl

6 غرام Bacto-agar

+ لتر ماء مقطر PH 7.2 - تعقيم

: LB Broth

10 غرام Bacto-tryptone

5 غرام Bacto-yeast extrct

10 غرام Nacl

+ لتر ماء مقطر PH 7.2 - تعقيم

: (DMEM) Dulbeccos modified Eagles medium

علبة باودر DMEM تكفي لتحضير 10 لتر

10 لتر ماء مقطر مؤين d_nH_2O

23.0 غرام (Analar) $NaHco_3$

10.4 غرام Nacl

50 سم3 بنسلين/ستربتومايسين 10.000 وحدة/سم3

رشح الوسط الغذائي وعقمه من خـــلال الترشــــيح عبر فلترات دقيقة جـــداً واحفظ الوسط في قناني 500 سم3 معقمة بدرجة حرارة ≈مْ . كما يمكن شراء الوسط الغذائي جاهزاً .

McCoy's 5A media :

100 سم3 Gibco MEM (Eagle)

10 سم3 Fetal bovine serum

2سم3 Phytohemagg lutinin

1سم3 Pencillen / Streptomycin 10.0004/ml

1سم3 L-glutamine

0.35 سم3 Sodium heparine

جميع هذه المحاليل معقمة ويجري مزجها في وسط معقم .

RPMI 1640 media :

وسط غذائي جاهز ومعقم .

RPMI 1640 + MEM alpha media :

100 سم3 RPMI 1640

70 سم3 MEM

2 سم3 3% L-Glutamine

30سم3 Fetal bovin serum

2سم3 Pens/strept. 10.000 u/ml

أمزج في جو معقم .

2 - محاليـــل

STE :

Nacl 0.1 M

Tris-cl 0.05 M

EDTA 0.01 M

في لتر ماء مقطر – PH 8.0

TE :

Tris - cl 10 mM

EDTA 1 mM

في لتر ماء مقطر - PH 7.2

MSB-EDTA :

Mannitol 0.21 M

Sucrose 0.07 M

Tris-cl 0.05 M

EDTA 0.01 M

في لتر ماء مقطر - PH 8.0

SM :

5.8 غرام Nacl

2 غرام MgSo4

50 سم3 1M Tris - cl

Gelatine %2

في لتر ماء مقطر – PH 7.0 – تعقيم

Maltose 0.2% :

0.2 غرام مالتوز + 100 سم3 ماء مقطر . عقم المحلول بالترشيح عبر فلتر تعقيم لمرتين .

Nacl 0.9% (محلول فسلجي) :

9 غرام Nacl في لتر ماء مقطر – تعقيم .

Thymidine (10 M) :

25 ملغرام ثايميدين + 100 سم 3 في لتر ماء مقطر معقم .

Methotrexate (MTX) (10 M) :

5 غرام + 100 سم3 ماء مقطر معقم . (صالح لمدة شهر واحد)

3 – مضادات حيويه :

أمبسلين Ampicilline :

500 ملغرام + 5 سم3 ماء مقطر معقم (50 ug/ml)

كلورومفينيكول Chloromphinicol :

500 ملغرام + 5 سم3 ماء مقطر معقم (50 ug/ml)

4 – أنزيمات :

تربسين 2.5% :

2.5 سم3 محلول تربسين

47.5 سم3 محلول فسلجي

في حالة الحاجة إلى اضافة EDTA للتربسين . يضاف 1 سم3 من محوى 0.01 M EDTA.

كولاجينيز Type III :

عبوات جاهزة للإستعمال 100 وحدة/سم3 .

محلول هانكس HBSS :

8 غرام	Nacl
400 ملغرام	Kcl
185 ملغرام	$Cacl_2 . 2H_2O$
47.5 ملغرام	$Na_2 HP0_4$ anhyd
60 ملغرام	$KH_2 PO_4$
350 ملغرام	$NaHCo_3$
200 ملغرام	$MgSo_4 . 7H_2O$
1 غرام	Glucose
17 ملغرام	Phenol red

أذب في لتر ماء مقطر – PH 7.0 – عقم المحلول عبر فلترات تعقيم .

متفرقات أخرى

كلوروفورم

فينول

أيزوأميل

أيزوبروبانول

ماء مقطر معقم

مطهـــر

جليسيرين معقم

زراعة البكتريا

1 – ازرع البكتريا المطلوب استخلاص مادتها الوراثية DNA على وسط غذائي صلب في أطباق بتري . احضن الاطباق مقلوبة بدرجة حرارة 37.5مْ (أو الدرجة الحرارية المناسبة) لمدة 24 ساعة .

2 – انقل جزء من واحدة من مستعمرات البكتريا الى دورق بحجم 100 سم3 يحتوي على 50 سم3 وسط غذائي سائل (بروث) مناسب .

3 – احضن الدورق بدرجة حرارة 37.5مْ (أو الدرجة الحرارية المناسبة) في حاضنة هزازة عند درجة هز 200 دوره في الدقيقة (rpm) لمدة 24 ساعة .

4 – خذ 1 سم3 من مزرعة البكتريا السائلة السابقة وانقله الى دورق 100 سم3 يحتوي على 50 سم3 وسط غذائي سائل .

5 – احضن دورق البكتريا عند درجة حرارة 37.5مْ في حاضنة هزازة بدرجة هز 200 دوره في الدقيقة حتى وصول الكثافة الضوئية للمزرعة الى قيمة 0.5 عند طول موجي 600 .

ملاحظة :
يمكن معرفة ذلك بأخذ 1سم3 من المزرعة كل 15 دقيقة وقياس كثافته الضوئية عند طول موجي 600 nm بإستخدام جهاز مقياس الكثافة الضوئية Spectrophotometer (يمكن الحصول على القيمة المطلوبة بعد 30 – 45 دقيقة غالباً) .

6 – بعد وصول المزرعة الى الكثافة الضوئية المناسبة ، انقل وسط المزرعة الى أنابيب طرد مركزي معقمة .

7 – اطرد الأنابيب مركزياً بقوة 2500 دورة في الدقيقة لمدة 10 دقائق .

8 – تخلص من الراشح وأذب راسب البكتريا بواسطة 1- 2 سم3 من محلول STE .

9 – امزج جيداً واحفظ نماذج الخلايا في أنابيب استخلاص زجاجية صلبة (Pyrex) . احفظ بدرجة حرارة 4مْ حتى استخدامه في الاستخلاص .

ملاحظة :

يمكن الحصول على 50 – 100 مايكروجرام (ug) من الـ DNA بهذه الطريقة . وفي حالة الحاجة الى كمية اكبر من DNA يتم زيادة حجم كمية المزرعة المستخدمة في الخطوة 4 .

زراعة البكتريا لأستخلاص البلازميدات

تناسب هذه الطريقة استخلاص العديد من البلازميدات مثل :

pSp 64 ، pSp 65 ، pAM 18 ، pAM 19 اضافة لبلازميدات كثيرة أخرى خصوصاً تلك التي تحمل مورث مقاومة مضاد حيوي معين .

الطريقة الأولى :

1 – ازرع البكتريا المطلوب استخلاص بلازميداتها في دورق حجم 50 سم^3 يحتوي على 20 سم^3 من وسط غذائي سائل (بروث) مقوى بمضاد حياتي مناسب (50 مايكروجرام/سم^3) .

2 – احضن دورق المزرعة بدرجة حرارة 37.5 مْ في حاضنة هزازة بدرجة هز 200 دوره في الدقيقة لمدة 24 ساعة .

3 – انقل 1 سم^3 من مزرعة البكتريا الى دورق حجم 25 سم^3 يحتوي على 10 سم^3 وسط غذائي سائل مقوى بالمضاد الحياتي بنفس التركيز السابق .

4 – احضن دورق المزرعة بدرجة حرارة 37.5 مْ في حاضنة هزازة بدرجة هز 200 دوره في الدقيقة حتى وصول المزرعة الى كثافة ضوئية تساوي 0.5 عند طول وجي 600 nm (O.D600 = 0.5) .

5 – انقل محلول المزرعة الى أنابيب طرد مركزي . اطرد مركزياً بقوة 2500 دوره في الدقيقة لمدة 10 دقائق .

6 – تخلص من الراشح وأذب راسب البكتريا بإضافة 0.5سم^3 من محلول STE الى جميع الأنابيب .

7 – امزج راسب البكتريا جيداً مع محلول STE وانقل جميع محتويات الأنابيب الى أنبوبة استخلاص زجاجية صلبة .

8 - احفظ النموذج بدرجة حرارة - 20 مْ حتى استخلاص البلازميدات .

الطريقة الثانية :

1 - ازرع البكتريا المطلوب استخلاص بلازميداتها في دورق حجم 50 سم3 يحتوي على 20 سم3 وسط غذائي سائل (بروث) مناسب .

2 - احضن دورق المزرعة بدرجة حرارة 37.5 مْ في حاضنة هزازة بدرجة هز 200 دورة في الدقيقة لمدة 24 ساعة .

3 - أضف الى **مزرعة البكتريا 15 سم3** من الوسط الغذائي السائل مع المضاد الحيوي **كلورومفينكول بتركيز 50** مايكروجرام/سم3 .

ملاحظة :
اضافة الكلورومفينكول الى مزرعة البكتريا يؤدي الى تثبيط تصنيع البروتينات في خلايا البكتريا مما يؤدي الى ايقاف انقسامها أو تخفيض سرعته كثيراً بينما لا يتأثر تضاعف البلازميدات بذلك ما يؤدي الى الحصول على بكتريا ذات نسخ عديدة من البلازميدات .

4 - احضن دورق المزرعة لفترة 24 ساعة اخرى تحت نفس الظروف السابقة .

5 - انقل محلول المزرعة الى أنابيب طرد مركزي .

6 - اطرد الأنابيب مركزياً بقوة 2500 دورق في الدقيقة لمدة 10 دقائق .

7 - تخلص من الراشح وأذب راسب الخلايا بإضافة 0.5 سم3 من محلول STE لكل أنبوب .

8 - امزج جيداً ثم أنقل محتويات الأنابيب الى أنبوبة استخلاص زجاجية صلبة نظيفة .

9 - احفظ النموذج بدرجة حرارة 4 مْ حتى استخلاص البلازميدات .

أنشاء مزارع عاثيات البكتريا (لامبدا)

هناك العديد من سلالات بكتريا القولون E.Coli التي تستخدم لتربية وتكثير عاثيات لاميـدا . كما أن هناك العـديد من مشـتقات هـذا العاثي . لذلك فإنه سيتم الحديث عن تربية وتكثير العاثي EMBL4 المشتق من العاثي لاميدا وبكتريا القولون E.coli P2392 كمضيف لها . يمكن الاستفادة من هذ الطريقة لتربية أعداد اخرى من العاثيات مع تحويرات بسيطة .

أولاً: تربية وتكثير العاثيات بكميات صغيرة:

يتم الحصول في هذه الطريقة على كمية قليلة من العاثيات لأجل الفحوصات السريعة للمادة الوراثية ، هناك طريقتين لذلك هما :

الطريقة الأولى :

1 - ازرع بكتريا القولون E.coli p2392 على وسط غذائي صلب في طبق بتري واحضنه بدرجة حرارة 37.5 مْ لمدة 24ساعة .

2 - انقل جزء من واحدة من مستعمرات البكتريا الى دورق حجم 50 سم^3 يحتوي على 20 سم^3 وسط غذائي سائل (بروث) .

3 - احضن الدورق بدرجة حرارة 37.5 مْ في حاضنة هزازة بدرجة هز 100 دورة في الدقيقة لمدة 24 ساعة .

4 - انقل 1 سم^3 من محلول البكتريا الى دورق حجم 500 سم^3 يحتوي على 50 سم^3 وسط غذائي سائل .

5 - احضن دورق المزرعة في حاضنة هزازة بدرجة هز 200 دوره في الدقيقة بدرجة حرارة 37.5 مْ حتى وصول الكثافة الضوئية لمحلول البكتريا الى قيمة 1 عند طول موجي 600 nm (O.D 600 = 1) .

6 – خفف كثافة البكتريا في المزرعة بإضافة أربعة أمثال حجم الوسط الغذائي للمزرعة الأساسية من وسط غذائي سائل جديد مقوى بكبريتات المغنيسيوم $MgSo_4$ (10 mM) (حوالي 200 سم3 وسط غذائي جديد) .

7 – انـقـل 10 سـم3 من محلول البكتريا الى كل من ثلاثة أطباق بتري فارغة ونظيفة .

8 – انقل مستعمرة واحدة من مستعمرات العاثي بواسطة ماصة باستور معقمة الى كل من أطباق البكتريا الثلاث .

ملاحظـــــة :   تظهر مستعمرات العاثيات على الوسط الغذائي كحلقات دائرية شفافة مقارنة مع مناطق الوسط الغذائي الاخرى .   لأجل نقل هذه المستعمرات بالماصة ، اغرز نهاية الماصة الدقيقة فوق المستعمرة بصورة عمودية . ارفع الماصة (ستدخل المستعمرة في تجويف نهاية الماصة) وانقل المستعمرة الى أطباق البكتريا .

9 – احضن أطباق الزراعة بدرجة حرارة 37.5 مْ في حاضنة هزازة بدرجة هز 150 دورة في الدقيقة لمدة 24 ساعة .

ملاحظـــــة :   بعد 2 – 4 ساعات تصبح المزارع الناجمة عكرة المظهر وبعد مضي 7 – 24 ساعة تبدأ خلايا البكتريا بالتحليل وتظهر رواسب بيضاء في قعر أطباق المزارع وكذلك تحول سائل المزارع الى الهيئة الرائقة .

10 – أضف 1.5 سم3 من الكلوروفورم الى كل طبق من أطباق المزارع .

11 – احضن الاطباق بدرجة حرارة 37.5 مْ لدقيقتين .

12 – انقل محتويات الاطباق الى أنابيب استخلاص زجاجية صلبة نظيفة . احفظ بدرجة حرارة – 20 مْ حتى استخلاص الـ DNA .

الطريقة الثانيـــــة :

1 – ازرع بكتريا القولون E.coli P2392 على وسط غذائي صلب في طبق بتري واحفظه بدرجة 37.5 مْ لمدة 24 ساعة .

2 – انقل جزء من مستعمرة واحدة من البكتريا الى دورق حجم 50 سـم3 يحتوي على 20 سم3 وسط غذائي سائل (بروث) .

3 – احضن دورق مزرعة البكتريا بدرجة حرارة 37.5 مْ في حاضنة هزازة بدرجة هز 200 دورة في الدقيقة حتى وصول الكثافة الضوئية للمزرعة الى قيمة 0.5 عند طول موجي 600 ($O.D._{600} = 0.5$) .

4 – انقل 200 مايكروليتر من مزرعة البكتريا الى ثلاثة أنابيب واسعة الفوهة . أضف 1 مايكروليتر من محلول العاثي للأنبوبة الاولى و 10 مايكروليتر من محلول العاثي الى الانبوبة الثانية و100 مايكروليتر للأنبوبة الثالثة .

5 – أمزج محاليل الأنابيب الثلاثة واحضنها بدرجة حرارة 37.5 مْ لمـــدة 20 دقيقة .

6 – أضف 3 سم3 من الوسط الغذائي نصف الصلب (Top agar) الدافىء لكل أنبوبة .

7 – امزج محتويات الانابيب جيداً وصب محتويات كل منها على سطح وسط غذائي صلب في أطباق بتري .

ملاحظـــــة :
ثبت علامات على أطباق بتري الثلاث مبيناً تركيز العاثيات المستخدمة (1 ، 10 ، 100 مايكروليتر) .

8 – اترك أطباق المزارع بدرجة حرارة الغرفة لمدة نصف ساعة حتى تصلب الطبقة العلوية ثم حضنها بدرجة حرارة 37.5 مْ لمدة 24 – 48 ساعة .

9 – افحص الاطباق الثلاثة . ان وجود دوائر شفافة يعني وجود مستعمرات العاثيات وكلما كانت الدوائر كثيرة العدد كبيرة الحجم كانت كمية العاثيات جيدة .

10 – اضف 5سم3 من محلول SM الى كل طبق يحتوي على مزارع كثيرة من العاثيات . اترك الاطباق بدرجة حرارة الغرفة لمدة 2 – 4 ساعة لتمكين العاثيات من الانتشار من الوسط الغذائي الى محلول SM .

11 – اجمع محلول SM (الذي يحتوي على العاثيات) في أنابيب استخلاص زجاجية صلبة نظيفة واحفظها بدرجة حرارة 4مْ حتى استخلاص الـ DNA منها .

ثانياً : تربية وتكثير العاثيات بكميات كبيرة:

1 – انقل 1 سم3 من مزرعة القولون E.coli P2392 سائلة سبق حضانتها لمدة 24 ساعة الى دورق حجم 100 سم3 يحتوي على 50 سم3 وسط غذائي سائل (بروث) .

2 – احضن الدورق بدرجة حرارة 37.5مْ في حاضنة هزازة بدرجة هز 200 دورة في الدقيقة حتى وصول الكثافة الضوئية للمزرعة الى قيمة 0.5 عند طول موجي 600 (O.D.600 = 0.5) .

3 – انقل 0.5 سم3 من مزرعة البكتريا الى دورق 100سم3 يحتوي على 50سم3 من الوسط الغذائي السائل مقوى بـ 0.5سم3 من محلول كبريتات المغنيسيوم MgSo4 (1M) و0.5 سم3 من محلول 0.2% مالتوز .

حضر ثلاثة دوارق بنفس الطريقة .

4 – أضف 1 ، 10 ، 100 مايكروليتر من محلول العاثيات الى دوارق مزارع البكتريا الاول ، الثاني والثالث على التوالي .

ملاحظـــــة :
ثبت المعلومات الخاصة بتركيز العاثيات على الدوارق .

5 – احضن دوارق المزارع الثلاثة بدرجة حرارة 37.5 مْ في حاضنة هزازة بدرجة هز 200 دورة في الدقيقة لمدة 24 – 48 ساعة .

ملاحظـــــة :
الدوارق التي تحتوي على التركيز الصحيح من البكتريا والعاثيات سوف تُظهر تحلل كبير في البكتريا وراسب أبيض في قعر الدوارق وصفاء في المزرعة .

6 – احفظ الدوارق التي تحتوي على العاثيات بدرجة حرارة 4مْ حتى استخلاص الـ DNA منها .

أنشاء مزارع الدم

1 - اسحب 5 سم3 من الدم . اخلط نموذج الدم مع مانع التخثر في قنينة خاصة بذلك .

2 - ازرع 0.75 سم3 من الدم في قنينة زراعة مزودة بـ 10سم3 من الوسط الغذائي المناسب (وسط ماكوي McCoy's 5A أو وسط RPMI 1640) وأغلقها جيداً .

استخدم 3 - 4 قناني في الزراعة للحصول على كمية لا بأس بها من الخلايا لعملية استخلاص الـ DNA .

3 - احضن قناني المزارع عمودياً بدرجة حرارة 37.0 مْ لمدة 72 ساعة في حاضنة 5% ثاني أوكسيد الكاربون .

4 - اسحب الوسط الغذائي من قناني الزراعة بهدوء بإستثناء 2 سم3 .

5 - رج قناني الزراعة لأجل الحصول على محاليل خلايا .

6 - انقل محاليل خلايا الدم الى أنابيب طرد مركزي معقمة .

7 - اطرد الأنابيب مركزياً بقوة 4000 دورة في الدقيقة لمدة 10 دقائق .

8 - تخلص من الراشح وأعد اذابة الخلايا الدموية بإضافة 3 سم3 من الماء المقطر المعقم . اترك القناني لمدة 5 دقائق .

9 - اطرد الأنابيب مركزياً بقوة 2500 دورة في الدقيقة لمدة 5 دقائق .

10 - تخلص من طبقة الراشح الحمراء وأذب خلايا الدم البيضاء المترسبة بإضافة 1سم3 من المحلول الفسلجي .

11 - اجمع محاليل الخلايا الدموية الناتجة من الخطوة السابقة في أنبوبة أو انبوبتا استخلاص زجاجية صلبة نظيفة .

12 - احفظ نماذج الخلايا بدرجة حرارة - 20مْ حتى استخلاص الـ DNA منها .

أنشاء مزارع نخاع العظم

1 - اسحب 1.5 - 3سم3 من نخاع العظم بمحقنة طبية مزودة بصوديوم الهيبارين واحفظ النموذج في قنينة مزودة بمانع التخثر أيضاً .

2 - ازرع 0.75 سم3 من نخاع العظم في قنينة زراعة (يستخدم لذلك عادة قناني نوع T - 75) مزودة بـ 10سم3 من الوسط الغذائي المناسب لذلك (وسط RPMI 1640 أو وسط MEM alpha) . استخدم 4 قناني زراعة أو أكثر اعتماداً على كمية نخاع العظم المتوفرة . أغلق القناني جيد بعد نهاية الزراعة .

3 - احضن قناني الزراعة عمودياً بدرجة حرارة 37.5مْ في حاضنة 5% ثاني أوكسيد الكاربون لمدة 72 ساعة .(ارخي قليلاً اغطية القناني داخل الحاضنة للسماح لثاني أوكسيد الكاربون بالنفاذ) .

4 - بإستخدام ماصة معقمة امزج الوسط الغذائي مع مستعمرات الخلايا للحصول على محلول خلايا وذلك عن طريق سحب الوسط الغذائي ثم دفعه بقوة نحو الاسفل ولعدة مرات .

5 - وزع محلول الخلايا على عدة أنابيب طرد مركزي معقمة ثم أطردها مركزياً بقوة 2500 دورة في الدقيقة لمدة 5 دقائق .

6 - تخلص من معظم الراشح ثم امزج ما تبقى منه مع راسب الخلايا .

7 - اجمع محلول الخلايا في أنبوبتي استخلاص زجاجية صلبة ونظيفة .

8 - احفظ النماذج بدرجة حرارة - 20 مْ حتى استخدامها في استخلاص الـ DNA .

أنشاء مزارع الدم المتزامنة

1 - اسحب 3 -5 سم^3 من نموذج الدم أو نخاع العظم واحفظه في قنينة دم مزودة بمانع التخثر .

2 - ازرع 0.75 سم^3 من النموذج في قنينة زراعة مزودة بـ 10 سم^3 من الوسط الغذائي + 0.1 سم^3 من مادة MTX Methotrexate عيارية 10.0 . ازرع أكثر من قنينة تبعاً لحجم نموذج الدم أو نخاع العظم .

3 - احضن قناني الزراعة عمودياً بدرجة حرارة 37.0 مْ لمدة 17 ساعة في حاضنة 5% ثاني أوكسيد الكاربون .

ملاحظـــة :

يعمل MTX كمثبط لعمليات أيض الثايميدين مما يؤدي الى إيقاف دورة الخلايا Cell cycle عند مرحلة تضاعف الـ DNA (S-phase) . وبعد مرور 17 - 72 ساعة من حضانة المزارع فإنه سيكون حوالي 95% من الخلايا في هذه المرحلة .

4 - امزج الخلايا مع الوسط الغذائي بإستخدام ماصة معقمة ثم انقل محلول الخلايا الى أنابيب طرد مركزي معقمة .

5 - اطرد الأنابيب مركزياً بقوة 1000 دورة في الدقيقة لمدة 5 دقائق .

6 - تخلص من الراشح وأضف 10 سم^3 من الوسط الغذائي الدافىء + 0.1 سم^3 ثايميدين (30 ملغرام/سم^3) وامزجه جيداً مع راسب الخلايا .

ملاحظـــة :

اضافة الثايميدين يؤدي الى السماح بإستمرار إيضة خلوياً مرة أخرى لعدم وجود مادة MTX ثم استمرار الخلايا في الدخول جميعاً الى المرحلة التالية من دورة الخلايا .

7 - انقل محاليل الخلايا الى قناني الزراعة واحضنها مرة أخرى تحت نفس الظروف السابقة .

ملاحظـــة :

المزارع الان جاهزة ومتزامنة ويمكن السيطرة عليها للحصول على خلايا في مرحلة معينة من مراحل دورة الخلية أو لاستخلاص الـ DNA .

أنشاء مزارع نسيجية من خلايا محفوظة

1 - ارفع قنينة الحفظ الخاصة بالخلايا المطلوبة من خزان النيتروجين السائل .

2 - اترك قنينة الخلايا المحفوظة بدرجة حرارة الغرفة لمدة 20 - 25 دقيقة .

3 - انقل 0.25 سم3 من محلول الخلايا الى قنينة زراعة حجم 25 سم3 تحتوي على 5 سم3 من الوسط الغذائي المناسب (DMEM مثلاً) . أعد نموذج الخلايا المحفوظة الى خزان النيتروجين السائل مرة أخرى .

4 - احضن قنينة الزراعة بدرجة حرارة 37.5 مْ في حاضنة 5% ثاني أوكسيد الكاربون لمدة 24 - 72 ساعة حتى اكتمال نمو طبقة الخلايا .

5 - اسحب الوسط الغذائي من قنينة الزراعة وأضف الى طبقة الخلايا 2 سم3 من محلول التربسين 0.25% .

6 - وزع محلول التربسين على سطح المزرعة عن طريق تقليب قنينة الزراعة يميناً وشمالاً لمدة 30 - 60 ثانية .

ملاحظة :

يمكن معرفة الفترة المناسبة للتعرض للإنزيم من خلال فحص سطح المزرعة بالمجهر (قوة 10 X) دون فتح قناني الزراعة . في حالة مشاهدة تفكك النسيج اسحب محلول الانزيم مباشرة .

7 - اضف 5 سم3 من الوسط الغذائي الى قنينة الزراعة .

8 - رج قنينة الزراعة للحصول على محلول الخلايا .

9 - اعد زراعة 0.5 سم3 من محلول الخلايا في عدد من قناني الزراعة حجم 50 سم3 مزودة بـ 10 سم3 من الوسط الغذائي في كل منها .

10 – احضن قناني الزراعة بدرجة حرارة 37.5 مْ في حاضنة 5% ثاني أوكسيد الكاربون لمدة 48 – 72 ساعة حتى اكتمال نمو طبقة الخلايا فيها .

11 – تخلص من الوسط الغذائي وأضف 3 – 4 سم3 من محلول التربسين 0.25% الى كل قنينة زراعة .

12 – وزع محلول الانزيم على سطح طبقة الخلايا كما في الخطوة 6 .

13 – اضف 3 سم3 من الوسط الغذائي لكل قنينة زراعة ، رج القناني للحصول على محلول خلايا .

14 – انقل محلول الخلايا الى أنابيب طرد مركزي معقمة .

15 – اطرد الأنابيب مركزياً بقوة 4000 دورة في الدقيقة لمدة 10 دقائق .

16 – تخلص من الراشح وأضف 1 سم3 من محلول STE لكل أنبوبة .

17 – امزج الخلايا مع محلول STE واجمع الخلايا في أنبوبتي استخلاص زجاجية صلبة نظيفة .

18 – احفظ النماذج بدرجة حرارة – 20 مْ حتى استخلاص الـ DNA .

أنشاء مزارع نسيجية من أنسجة حية

الطريقة الأولى :

> **ملاحظـــة :**
>
> يجب أن يعقم الجزء المراد انشاء المزرعة منه قبل القطع بواسطة مسحة بقطنة مبللة بالكحول المطلق .

1 - اقطع جزء مناسب من النسيج المطلوب وانقله بالملقط الى طبق بتري متوسط الحجم معقم .

2 - اضف 1 - 3 سم3 من محلول MSB-EDTA الى نموذج النسيج ثم اقطعه بواسطة شفرة حادة وقوية الى قطع صغيرة جداً وبسرعة .

3 - اضف 1 سم3 من التربسين 0.25% الى خليط قطع النسيج واستمر في هرس وتقطيع النسيج لفترة 1 - 2 دقيقة أخرى ثم احضنه لمدة ساعة بدرجة حرارة 37.0 مْ .

4 - اسحب محلول الخلايا من طبق خليط القطع النسيجية بماصة باستور معقمة وانقله الى أنبوبة طرد مركزي معقمة . (يفضل استخدام أنابيب أبندروف Eppendroff tubes صغيرة) .

5 - اطرد الأنابيب مركزياً بقوة 2500 دورة في الدقيقة . لمدة 5 دقائق .

> **ملاحظـــة :**
>
> يمكن اضافة 1 سم3 من محلول MSB-EDTA الى بقايا الانسجة وهرسها وإضافة التربسين لأجل الحصول على المزيد من الخلايا .

6 - تخلص من الراشح وأضف 1 - 2 سم3 من الوسط الغذائي لاذابة راسب الخلايا .

7 - امزج الخلايا مع الوسط الغذائي جيداً وانقل محلول الخلايا الى قنينة زراعة حجم 25 سم3 مزودة بـ 8 سم3 من الوسط الغذائي (DMEM مثلاً) .

ملاحظـــــة :
وزع محلول الخلايا على قنينتين من قناني الزراعة لتوفير فرص افضل .

8 - احضن قناني الزراعة أفقياً بدرجة حرارة 37.5 مْ في حـاضنة 5% ثـانـي أوكسيد الكاربون لمدة 24 - 48 ساعة .

ملاحظـات :
- يضاف الامبسلين كمضاد حياتي 50 مايكروجرام/سم3 الـى الوسط الغذائي لحماية المزارع من التلوث بالكبتريا .
- لا تغلق اغطية قناني الزراعة تماماً لتمكين غاز ثاني أوكسيد الكاربون من النفوذ الى داخل القناني لمعادلة حامضية الوسط الغذائي .
- استبدل الوسط الغذائي كل 24 ساعة .

9 - افحص نمو وانقسام الخلايا كل 24 ساعة عن طريق فحص قناني الزراعة دون فتحها تحت المجهر (قوة 10 x) .

ملاحظـــــة :
في حالة نجاح الخلايا في النمو وتشكيل طبقة واحدة Confluent انتقل الى الخطوة التالية . اما في حالة احتياج الخلايا لفترة زمنية اضافية اترك الخلايا حتى اكتمال نموها .

10 - اسحب الوسط الغذائي من قناني الزراعة بماصة معقمة (احفظ السوائل غير المرغوب فيها في قنينة خاصة بذلك ثم تخلص منها بعد اضافة قليل

من المطهرات (Bleaches) .

11 - اضف 2 سم3 من التربسين 0.25% الى قنينة الزراعة . حرك القنينة يميناً وشمالاً لتوزيع محلول الانزيم على سطح الخلايا لمدة 50 - 60 ثانية ثم اسحب المحلول بماصة من احد زوايا القنينة .

12 - اضف 5 سم3 من الوسط الغذائي الى قنينة الزراعة وامزج المحلول مع الخلايا عن طريق سحب المحلول بالماصة ودفعة مرة أخرى لعدة مرات حتى الحصول على محلول خلايا مفردة .

13 - احسب عدد الخلايا الموجودة في كل سم3 من المحلول بإستخدام عداد الهيموسايتوميتر Haemocytometer Counter .

14 - خذ 0.5 سم3 من محلول الخلايا واخلطه مع 0.5 سم3 من الجليسرين المعقم واحفظه في قنينة خاصة في النيتروجين السائل مع تثبيت كافة المعلومات على قنينة الحفظ وبالقلم الرصاص للرجوع اليها في حالة الحاجة لذلك .

15 - ازرع 1 سم3 من محلول الخلايا (من الخطوة 12) في قنينة زراعة حجم 150 -200 سم3 مزودة بـ 20 سم3 من الوسط الغذائي .

16 - احضن القنينة افقياً بدجة حرارة 37.5مْ لمدة 48 - 72 ساعة في حاضنة 5% ثاني أوكسيد الكاربون .

17 - بعد وصول الخلايا الى مرحلة تكوين طبقة خلايا ، اسحب الوسط الغذائي بماصة باستور معقمة .

18 - اضف 5 سم3 من التربسين 0.25% الى قنينة الزراعة . حرك القنينة يميناً وشمالاً لمدة 50 - 60 ثانيةثم اسحب محلول الانزيم بماصة من احد زوايا القنينة .

19 - اضف 5 سم3 من الوسط الغذائي الى قنينة الزراعة . امزج جيداً كما في الخطوة 12 .

20 - اجمع محلول الخلايا في قناني طرد مركزي واطردها مركزياً بقوة 4000 دورة في الدقيقة لمدة 10 دقائق .

21 - تخلص من الراشح واذب الخلايا بإضافة 3 سم3 من محلول STE . امزج جيداً واحفظ بدرجة حرارة - 20مْ حتى استخلاص الـ DNA .

الطريقة الثانيــة :

تحفظ الأنسجة الحية المطلوب انشاء مزرعة نسيجية لها في قنينة تحتوي على مصل الدم أو وسط غذائي أو محلول فسلجي معقم لاجل الحفاظ عليها حية ورطبة . يمكن اسخدام هذه الانسجة مباشرة أو يمكن حفظها لمدة 24 ساعة .

1 - انقل نموذج النسيج الى طبق بتري زجاجي معقم .

2 - اقطع النسيج بإستخدام شفرة جراحية حادة معقمة الى قطع صغيرة جداً ورقيقة .

3 - أضف 1 سم3 من الوسط الغذائي الى خليط القطع النسيجية .

4 - انقل خليط القطع النسيجية الى قنينة زراعة نوع 25 -T وحرك القنينة يميناً وشمالاَ حتى استقرار قطع الانسجة على سطح قنينة الزراعة .

5 - أضف 4 سم3 من الوسط الغذائي الى قنينة الزراعة واحضنها لمدة 5 - 6 أيام بدرجة حرارة 37.5مْ في حاضنة 5% ثاني أوكسيد الكاربون .

ملاحظــة :
يمكن اضافة أمبسلين/ستربتومايسين الى الوسط الغذائي بتركيز 100.000 وحدة/سم3 .

6 - لا تغلق غطاء قنينة الزراعة بقوة للسماح لثاني أوكسيد الكاربون بالنفوذ الى الداخل وغيّر الوسط الغذائي كل ثلاثة أيام بعد سحب الوسط الغذائي القديم من القنينة .

ملاحظـــة :

في نهـاية فـتـرة الحـضـانة حـضـر ثلاثة أطـبـاق بتـري مـعـقـمـة الاول يحتوي على محلول هانكس Hank's Solution (HBSS) والثـاني 2 سم3 من محلول تربسين : HBSS : EDTA بتركيز نهائي 0.0625% والثالث لوضع الانسجة فيه .

7 – انقل الانسجة النامية من قنينة الزراعة الى طبق بتري الثالث .

8 – انقل الانـسـجـة بالملقط المعـقـم وغطسـهـا في مـحلول هانكس في طبق بتـري الاول لعدة مرات ثم ضعها في محلول التربسين – الطبق الثاني .

9 – احـضـن طبق قطع الانسـجـة + التـربـسـين (الطبـق الـثـاني) لمدة سـاعـة واحـدة بدرجة حرارة 37.5مْ .

10 – اسحب محلول التربسين من الطبق دون الأضرار بالانسجة واضف 2 سم3 من محلول أنزيم الكولاجينيز Type II Collagenase (100 وحـدة/سم3) . احضن الطبق لمدة نصف ساعة اخرى بدرجة حرارة 37.5مْ .

11 – انقل قطع الانـسـجـة مـسـتـخـدمـاً مـاصـة واسـعـة الفـتـحـة الى قنينة زراعـة مـزودة بـ 10 سم3 وسط غذائي .

ملاحظـــة :

يمكن استـخـدام مـاصـة مـيـكانيـكيـة حـجـم 1 ســم3 بعـد قطع الثلث الامـامي من القطعـة البـلاسـتـيكيـة Tip المسـتـخـدمـة في سـحـب السوائل .

12 – هشم الانسجة داخل قنينة الزراعة عن طريق سحب الوسط الغذائي بماصة معقمة ودفعه بقوة مرة اخرى ولعد مرات 20 – 30 مرة .

ملاحظـــة :

يمكن فحص وجود الخلايا بشكل مفرد بإستخدام مجهر بقوة x10 دون فتح القنينة .

13 – احضن قنينة الزراعة لمدة 72 ساعة بدرجة حرارة 37.5 مْ في حاضنة 5% ثاني أوكسيد الكاربون .

14 – عند وصول النمو الى مستوى جيد ، رج قنينة الزراعة بقوة مناسبة للحصول على محلول خلايا .

ملاحظـات :

- استخدم المجهر بقوة x10 لفحص نمو الخلايا في قنينة الزراعة .
- بدلاً من الخطوة 14 يمكن تفريغ قنينة الزراعة من الوسط الغذائي اضافة 2 سم3 من التربسين أو الكولاجينيز لمدة 50 – 60 ثانية ثم ازالة الانزيم واضافة 5 سم3 من الوسط الغذائي . وبإستخدام ماصة باستور يمكن مزج الخلايا مع الوسط الغذائي للحصول على محلول خلايا مفردة .

15 – خذ 0.5 سم3 من محلول الخلايا واضف اليه 0.5 سم3 من الجليسرين المعقم واحفظ النموذج في قنينة حفظ خاصة وضعه في النتروجين السائل لحين الحاجة اليه .

16 – اجمع ما تبقى من محلول الخلايا المفردة في أنبوبة طرد مركزي معقمة .

ملاحظـــة :

يمكن في هذه الخطوة اعـادة زراعـة الخـلايا في عـدة قناني للحصـول على كمية كبيرة من الخلايا وذلك بزراعة 1 سم^3 من محلول الخلايا لكل قنينة زراعة مع وجود 5 ســم^3 من الوسط الغذائي وحضانتها لـمـدة 72 ساعة أو أكثر بدرجة حرارة 37.5 مْ . وفي حالـة وجـود مـا يكفي من الخلايا لعملية الاستخلاص استمر في الخطوات التالية .

17 – اطرد الانبوبة مركزياً بقوة 4000 دوره في الدقيقة لمدة 10 دقائق .

18 – تخلص من الراشح وأعد اذابة راسب الخلايا بإضافة 2 ســم^3 مـن الوسـط الغذائي أو محلول STE .

19 – احفظ النموذج بدرجة حرارة – 20مْ لحين استخلاص الـ DNA منه .

الفصـل الثانـي

« استخلاص DNA الخلايا »

DNA Extraction

مواد عامة لازمة للعمل

1 - محاليـــل

: %25 SDS

25 غرام من Sodium Dodoceyl Sulphate + 100 سم3 ماء مقطر .

: TE

10 mM	Tris - cl
1 mM	EDTA

في لتر ماء مقطر – PH 7.2

: Lytic Solution

%1	SDS
0.2 N	NaoH

يتم تحضيره في فترة استخدامه فقط .

: NaAc Solution

3 M من Sodium acetate - PH 4.8

: SM

5.8 غرام	Nacl
2 غرام	MgSo4
50 سم3	1M Tris - Cl
%2	Gelatine

في لتر ماء مقطر – PH - 7.0 – تعقيم .

: Ethidium Bromide

100 ملغرام Ethidium Bromide + 10سم3 ماء مقطر (10 ملغرام/سم3) .

محلول فسلجي :

9 غرام Nacl + لتر ماء مقطر – تعقيم .

: (ELB) Erythrocytes Lytic Buffer

Tris - Cl	0.05 M
SDS	%0.5
Nacl	0.1 M
EDTA	0.001 M

أذب في 100 سم3 ماء مقطر – PH 7.2 .

: MSB - ca ++

Mannitol	0.21 M
Sucrose	0.07 M
Tris - c l	0.05 M
Cacl	3 mM

لتر ماء مقطر – PH 7.5 .

: MSB - EDTA

Mannitol	0.21 M
Sucrose	0.07 M
Tris - c l	0.05 M
EDTA	0.01 M

لتر ماء مقطر – PH 7.5 .

: STE

Nacl	0.1 M

Tris - cl 0.05 M

EDTA 0.01 M

لتر ماء مقطر – PH 8.0 .

2 – الأنزيمـات :

RNase A Solution :

10 غرام Pancreatic ribonuclease A

1 سم3 ماء مقطر معقم

أغلي محلول الانزيم في حمام مائي لمدة 10 دقائق ثم اتركه ليبرد بحرارة الغرفة . احفظ بدرجة حرارة – 20م° .

DNase I Solution :

10 ملغرام DNase I

10 سم3 من 0.15 M Nacl

50% جليسيرول معقم .

Proteinase K Solution :

20 ملغرام Proteinase K

1 سم3 ماء مقطر معقم

المحلول صالح للإستعمال لمدة 24 ساعة فقط .

2.5% Trypsin :

2.5 سم3 من محلول التربسين

47.5 سم3 من المحلول الفسلجي .

3 – مواد أخرى :

فينــــول

8 - hydroxy quinoline

كلوروفورم

كحول ايزوأميل

كحول ايزوبروبانول

كحول أثيلي مطلق

كلوريد السيزيوم CsCl

بولي اثيلين جلايكول PEG

برافين سائل

كحول بيوتانول

نتروجين سائل

تحضير محلول الفينول

يحتوي الفينول السائل المزود من الشركات على العديد من الشوائب مثل المعادن الثقيلة والأملاح وغيرها والتي من الممكن أن تؤدي الى تلوث الـ DNA المستخلص مما يؤدي الى صعوبة تقطيعه بالانزيمات القاطعة في الخطوات القادمة .

لذلك فإنه يجب غسل محلول الفينول جيداً قبل استخدامه في الاستخلاص .

1 – ضع قنينة سائل الفينول في حمام مائي بدرجة 65مْ لمدة نصف ساعة .

2 – اضف 0.1% من مادة 8 - hydroxy quinoline الى سائل الفينول وامزج جيداً بماصة زجاجية .

3 – اضف 10 – 20 سم3 من محول STE وامزج جيداً بواسطة ماصة زجاجية أو عمود زجاجي لمدة عشرة دقائق ثم اترك المحلول حتى يستقر لدقيقتين .

4 – تخلص من الطبقة العلوية بالماصة (تكون بيضاء تقريباً بسبب امتصاصها للشوائب) .

5 – اضف 10 – 20 سم3 اخرى من محلول STE وامزج محلول الفينول بعد ذلك جيداً لمدة 10 دقائق ثم أزل الطبقة العلوية بالماصة كما في الخطوة السابقة .

6 – اعد عمليات الغسيل السابقة لعشرة مرات . وفي نهاية العملية غطي سائل الفينول بطبقة نظيفة من محلول STE .

7 – وزع سائل الفينول على قناني زجاجية معتمة أو مغلفة بورق الالمنيوم بحجم 10 – 20سم3 ويراعى تغطية طبقة الفينول في كل قنينة بواسطة 1 – 2 سم3 بمحلول STE .

8 – اخزن قناني الفينول بعد تبريدها بدرجة حرارة – 20مْ حتى استخدامها .

تحضير محلول كلوروفورم : كحول ايزوأميل (24 :1)

امزج 96 سم3 من الكلوروفورم و 4 سم3 من كحول ايزوأميل في قنينة زجاجية محكمة الغلق وافتحها قليلاً بعد نهاية المزج واحفظها بعد ذلك في الثلاجة أو بدرجة حرارة 4مْ .

أستخلاص DNA البكتريا

1 - أضف الى محلول البكتريا (الخطوة 9 من زراعة البكتريا) 4 سم3 من محلول انزيم البروتينيز K Proteinase K تركيز 100 مايكروجرام/سم3 . امزج جيداً وبهدوء واحضن الانبوبة بدرجة حرارة 37.5 مْ لمدة 1 - 3 ساعة .

2 - اضف 200 - 300 مايكروليتر من محلول SDS (25%) أو 400 مايكروليتر من محلول SDS (10%) الى محلول الخلايا وأمزج جيداً بعمود زجاجي نظيف حتى تحوله الى محلول لزج . (يمكن في هذه المرحلة حفظ أنابيب الاستخلاص بدرجة حرارة - 20م لعدة أيام حتى استكمال الاستخلاص) .

3 - احضن انبوبة الاستخلاص (أو ربما عدة أنابيب) بدرجة حرارة 65مْ في حمام مائي .

4 - أضف سائل الفينول الى محلول الخلايا بحجم مساوي لحجم محلول الخلايا .

5 - امزج جيداً عن طريق غلق فوهة أنبوبة الاستخلاص بقطعة مطاط وتقليب المزيج لعدة مرات بصورة جيدة لمدة دقيقة .

6 - احضن انبوبة الاستخلاص في الحمام المائي 65 مْ لدقيقتين ثم أعد المزج مرة أخرى .

7 - كرر عملية المزج والحضانة بدرجة حرارة 65مْ لأربعة مرات وتجنب نهائياً مزج المحلول بطريقة الرج لأن ذلك يؤدي الى تحطم الـ DNA .

8 - اطرد انبوبة الاستخلاص مركزياً بقوة 4000 دورة في الدقيقة لمدة 10 دقائق .

ملاحظة :

في نهاية عملية الطرد المركزي سوف تحصل على ثلاثة طبقات . العلوية تمثل طبقة الـ DNA والوسطى بيضاء اللون تمثل طبقة البروتين والسفلى طبقة الفينول .

9 - اسحب طبقة الـ DNA العلوية بماصة نظيفة وانقلها الى أنبوبة استخلاص جديدة .

ملاحظة :

طبقتي الـ DNA والبروتين تكونان لزجتين عادة . لذلك لا تسحب بقايا طبقة الـ DNA المجاورة لطبقة البروتين ويمكن اضافة 2سم3 من الماء المقطر لبقايا طبقة الـ DNA ويعاد الطرد المركزي لتجميع المزيد من هذه الطبقة .

10 - أضف الى ملحول الـ DNA حجم مساوي من مزيج الفينول : كلوروفورم (50 : 50) .

11 - امزج جيداً كما في الخطوات 5 و6 و7 .

12 - اطرد انبوبة الاستخلاص مركزياً بقوة 4000 دوره في الدقيقة لمدة 10 دقائق .

ملاحظة :

في نهاية عملية الطرد المركزي ستحصل على ثلاثة طبقات أيضاً بنفس الترتيب السابق مع ملاحظة وجود بروتين خفيفة . ان سمك طبقة البروتين يعطي مؤشراً على كفاءة الاستخلاص بالفينول والكلوروفورم وكلما كانت الطبقة خفيفة جداً كانت كفاءة الاستخلاص عالية .

13 - اسحب طبقة الـ DNA العلوية بماصة باستور نظيفة وانقلها الى انبوبة استخلاص نظيفة .

14 - اضف حجم من مزيج كلوروفورم : ايزأميل مساوي لحجم محلول الـ DNA في أنبوبة الاستخلاص .

15 - امزج جيداً كما في الخطوات 5 و6 و7 .

16 - اطرد انبوبة الاستخلاص مركزياً كما في الخطوة 12 .

ملاحظـــات :

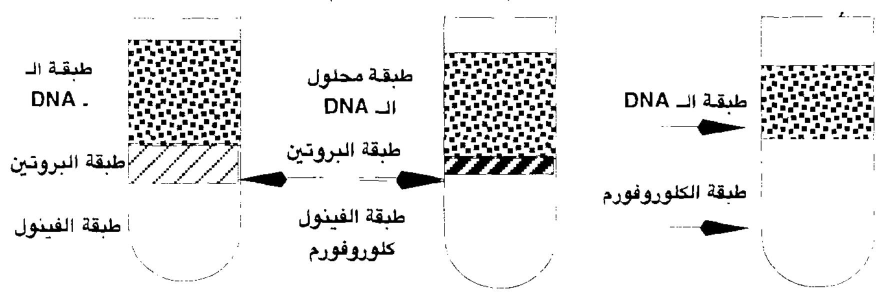
- يراعى الحذر الشديد في خطوات مزج المحاليل حيث تؤدي الحرارة العالية (65مْ) الى تبخر الفينول والكلوروفورم مكوناً ضغطاً شديداً داخل الأنابيب وتحت الأصابع مما قد يؤدي الى تطاير اجزاء من المحاليل على اليد والوجه في حالة ارتخاء الأصابع أثناء الاستخلاص .
- في نهاية الطرد المركزي عند هذه المرحلة ستحصل على طبقتين في الغالب . علوية تمثل الـ DNA وسفلية تمثل مزيج الكلوروفورم : ايزوأميل .

أما في حالة وجود طبقة بروتين خفيفة بينهما فإن محلول الـ DNA الذي سيتم الحصول عليه بحاجة الى استخلاص اضافي مع مزيج الكلوروفورم : أيزوأميل .

17 - اسحب طبقة الـ DNA العلوية بماصة باستور نظيفة وانقلها الى أنبوبة استخلاص جديدة (شكل 2 - 1) .

18 - رسب الـ DNA كما في الطريقة الخاصة بذلك (الطريقة التالية) .

شكل 2 - 1 : نتائج الطرد المركزي بعد الاستخلاص بالفينول فقط أو الفينـــول : كلوروفورم أو بالكلوروفورم فقط



ترسيب الـ DNA :

يستخدم في عملية ترسيب الـ DNA كحول أثيلي مطلق مثلج (- 20مْ) مع اضافة محلول ملحي من كلوريد الصوديوم Nacl بتركيز عالي . يقوم الكحول بوجود الأملاح بسحب الماء Dehydration من الـ DNA ويظهر الـ DNA بعد المزج كخيوط بيضاء طويلة في المحلول . ويمكن تقدير كمية الـ DNA في المحلول اعتماداً على كثافة هذه الخيوط (شكل 2 – 2) .

كما يمكن استخدام كحول ايزوبروبانول المثلج (- 20مْ) في حالة وجود محلول الـ DNA في أنابيب صغيرة .

1 – أضف الى محلول الـ DNA (الخطوة 17) 0.5 سم3 من محلول كلوريد الصوديوم عيارية 2 +2.5 حجماً من الكحول الأثيلي المطلق المثلج (-20 مْ) .

2 – امزج جيداً وبهدوء وبطريقة التقليب ثم احفظ انبوبة الاستخلاص بدرجة حرارة – 20 مْ لمدة 2 – 24 ساعة .

3 – اطرد الانبوبة مركزياً بقوة 3000 دورة في الدقيقة لمدة 10 دقائق .

ملاحظـــة :

في نهاية الطرد المركزي تلاحظ وجود راسب أبيض يمثل الـ DNA .

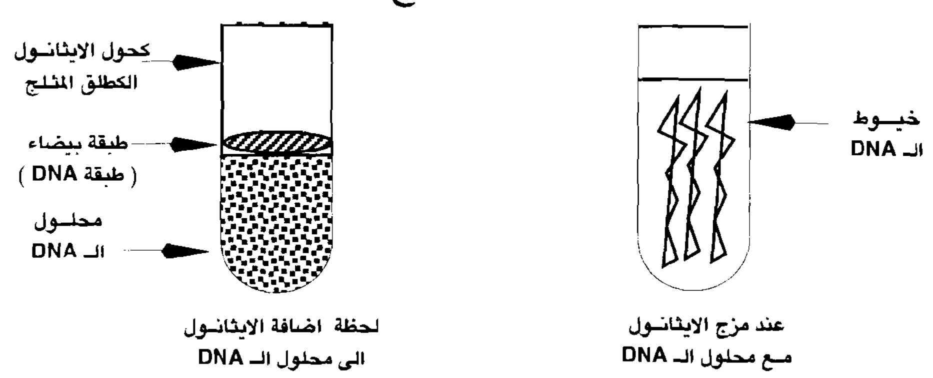
4 – تخلص من الطبقة السائلة بالسكب الهادىء السريع .

5 – غطي فوهة أنبوبة الـ DNA بغشاء من البرافلم واعمل عدة ثقوب في الغطاء ثم احفظ الانبوبة بدرجة حرارة 37.5 مْ لمدة 24 ساعة للتجفيف .

6 – أذب راسب الـ DNA بإضافة 100 – 500 مايكروليتر في حلول TE أو الماء القطر وانقل المحلول بعد ذلك الى أنبوبة أبندروف .

7 – احفظ نموذج الـ DNA بدرجة حرارة – 20 مْ حتى استخدامه .

شكل 2 - 2 : ترسيب الـ DNA باضافة كحول الايثانول المطلق المثلج .



تنقية الـ DNA من الـ RNA :

ان معظم نماذج الـ DNA المستخلصة تحتوي على الحاض النووي الريبوزي RNA . ولأجل الحصول على نموذج نقي للـ DNA يجب التخلص من الـ RNA بإضافة 5 مايكروليتر من انزيم R Nase A ثم اعادة الاستخلاص مرة ثانية .

ان وجود الـ RNA مع نموذج الـ DNA لا يؤثر اطلاقاً عند استخدام الـ DNA مع الانزيمات القاطعة أو الهجرة الكهربائية أو الهندسة مع ناقل . الا ان ذلك يصبح ضرورياً في بعض تجارب الهندسة الوراثية .

1 - اضف الى محلول الـ DNA 5 مايكروليتر من محلول RNase A تركيز 10 مايكروجرام/سم3 . امزج جيداً واحضن بدرجة حرارة 37.5 مْ لمدة 1 - 3 ساعة .

2 - أعد استخلاص نموذج الـ DNA بالفينول : كلوروفورم كما في الخطوات السابقة .

3 - رسب الـ DNA بعد نهاية الاستخلاص كما في الطريقة الخاصة بذلك . جفف ثم أذب الراسب بإضافة 100 - 500 مايكروليتر من محلول TE أو الماء المقطر المعقم .

4 - احفظ النموذج بدرجة حرارة - 20 مْ .

أستخلاص DNA البلازميدات

1 - أضف إلى أنابيب محلول البكتريا المراد استخلاص بلازميداتها (الخطوة 8 من الطريقة الاولى لزراعة بكتريا البلازميدات والخطوة 9 من الطريقة الثانية) 5 مايكروليتر من محلول انزيم RNase تركيز 10 مايكروجرام/سم3 لكل أنبوبة .

2 - أمزج جيداً واحضن الأنابيب بدرجة حرارة 37.5 مْ لمدة 10 دقائق .

3 - أضف 350 مايكروليتر من محلول التحليل Lytic Solution الى كل انبوبة . أمزج جيداً لمدة 5 دقائق بعمود زجاجي نظيف .

4 - احفظ الأنابيب في الثلج لمدة 10 دقائق .

5 - أضف 250 مايلكروليتر من محلول أستيات الصوديوم NaAc عيارية 3 الى كل أنبوبة وامزج جيداً .

6 - احفظ الأنابيب في الثلج لمدة 30 دقيقة أخرى .

ملاحظة :
سيترسب عند هذه الخطوة DNA البكتريا + البروتين على هيئة كتلة بيضاء اللون .

7 - اطرد الأنابيب مركزياً بقوة 1300 دوره في الدقيقة لمدة 10 دقائق .

8 - انقل الراشح الذي يحتوي البلازميدات الى أنبوبة استخلاص زجاجية صلبة ونظيفة .

9 - استخلص DNA البلازميدات بطريقة الفينول والكلوروفورم : أيزوأميل وكلوروفورم أو بطريقة الطرد المركزي الفائق مع ملح كلوريد السيزيوم التي سترد لاحقاً .

10 - رسب DNA البلازميدات حسب طريقة الترسيب السابقة . جفف نموذج الـ DNA ثم أذبه بإضافة 200 مايكروليتر من محلول TE .

11 - اجمع محلول DNA البلازميدات في أنبوبة أبندروف واحدة واحفظها بدرجة حرارة – 20 مْ .

أستخلاص DNA العاثيات

الاستخلاص المحدود لـ DNA العاثيات:

1 - أضف الى محلول العاثيات الناتج من التربية المحدودة للعاثيات (الطريقة الاولى والثانية) أنزيمات D Nase I و R Nase A بتركيز 1 مايكروجرام/سم^3 . امزج جيداً .

2 - احضن بدرجة حرارة 37.5 مْ لمدة نصف ساعة .

3 - اضف الى حلول العاثيات 0,25 غرام من مادة PEG - Polyethylene glycol + 0.58 غرام من ملح كلوريد الصوديوم Nacl . امزج جيداً حتى ذوبان الاملاح تماماً .

4 - احفظ الانبوبة أو الأنابيب في الثلج لمدة ساعة واحدة .

5 - اطرد الأنابيب مركزياً بقوة 4000 دوره في الدقيقة لمدة 10 دقائق .

6 - تخلص من الراشح وأذب راسب العاثيات الأبيض بإضافة 2 سم^3 من محلول SM .

7 - أضف 2 سم^3 من الكلوروفورم الى محلول العاثيات . امزج جيداً بالتقليب لمدة دقيقتان .

8 - اطرد الانبوبة أو الأنابيب مركزياً بقوة 1300 دورة في الدقيقة لمدة 5 دقائق .

9 - انقل طبقة الراشح (طبقة العاثيات) الى أنبوبة استخلاص نظيفة .

10 - أضف الى محلول العاثيات 100 مايكروليتر من محلول SDS (25%) + 2 مايكروليتر من محلول EDTA (0.5 M) امزج جيداً بعمود زجاجي .

11 - احضن الأنابيب بدرجة حرارة 65 مْ حمام مائي لمدة 5 دقائق .

12 - استخلص DNA العاثيات بطريقة الفينول : كلوروفورم كما ورد سابقاً في استخلاص DNA البكتريا .

13 - رسب الـ DNA بالكحول ، جفف النموذج وأعد اذابته بإضافة 200 مايكروليتر من محلول TE أو الماء المقطر .

14 - احفظ النموذج بدرجة حرارة - 20مْ .

الإستخلاص بالطرد المركزي مع ملح كلوريد السيزيوم

يمكن استخلاص DNA العاثيات (وكذلك البلازميدات) بطريقة الطرد المركزي الفائق Ultracentrifugation بوجود ملح كلوريد السيزيوم CsCl وحسب الطريقة التالية :

1 - انقل محلول العاثيات (خطوة 9 من الاستخلاص المحدود) الى أنبوبة نترات السليليوز Cellulose nitrate سبق غسلها بمحلول EDTA (0.5 M) ثم تجفيفها .

2 - أكمل حجم محلول العاثيات الى 10 سم3 بإضافة محلول STE .

3 - أضف 6 غرام من ملح كلوريد السيزيوم الى محلول العاثيات . امزج جيداً بعمود زجاجي نظيف حتى ذوبان الملح كلياً ثم أضف بروميد الأثيديوم 0.5 Ethidium Bromide مايكروجرام/سم3 .

4 - أضف برافين سائل فوق طبقة محلول العاثيات حتى نهاية أنبوبة الطرد المركزي .

5 - أغلق أنبوبة الطرد المركزي بالسدادة المعدنية الخاصة بذلك وتأكد من التخلص من جيع الفقاعات الهوائية .

ملاحظة :

يؤدي وجود الفقاعات الهوائية الى اضطراب الطرد المركزي مما يشتت الـ DNA في محلول الانبوبة .

لأجل التخلص من الفقاعات الهوائية يتم استخدام قطاره زجاجية دقيقة النهاية مملوءة بالبرافين السائل . يحقن البرافين من خلال مسمار الاغلاق في السدادة قليلاً قليلاً مع تحريك أنبوبة الطرد المركزي يميناً وشمالاً أو الضغط على الانبوبة وتحريرها مع استمرار حقن البرافين السائل .

وبعد التأكد من التخلص من جميع الفقاعات الهوائية أغلق مسمار السدادة جيداً .

6 – اطرد الانبوبة مركزياً في جهاز الطرد المركزي الفائق بقوة 50.000 - 60.000 دوره في الدقيقة لمدة 48 ساعة بدرجة حرارة 20مْ .

7 – افحص انبوبة الطرد المركزي تحت الاشعة فوق البنفسجية . تظهر طبقة الـ DNA كحلقة حمراء لماعة بسبب ارتباط بروميد الاثيديوم معها .

8 – اسحب طبقة الـ DNA هذه بإستخدام محقنة طبية نظيفة وانقلها الى أنبوبة زجاجية نظيفة (شكل 2 - 3) .

9 – تخلص من التركيز العالي لملح كلوريد السيزيوم في نموذج محلول الـ DNA وذلك بوضع محلول الـ DNA في حقيبة ديلزه Dialysis Bag ثم أغلقها بأحكام شديد وغطسها في حلول TE لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 4 مْ .

ملاحظـة :
يجب تغيير محلول TE خمسة مرات خلال تلك الفترة .

10 – تخلص من بروميد الاثيديوم المرتبط مع نموذج الـ DNA حسب الطريقة الخاصة بذلك .

11 – رسب الـ DNA بإضافة كحول الايزوبروبانول المثلج بحجم مساوي لحجم محلول الـ DNA + 0.5 سم3 من محلول كلوريد الصوديوم (2M) .

12 – احفظ الانبوبة بدرجة حرارة – 20 مْ لمدة 30 دقيقة .

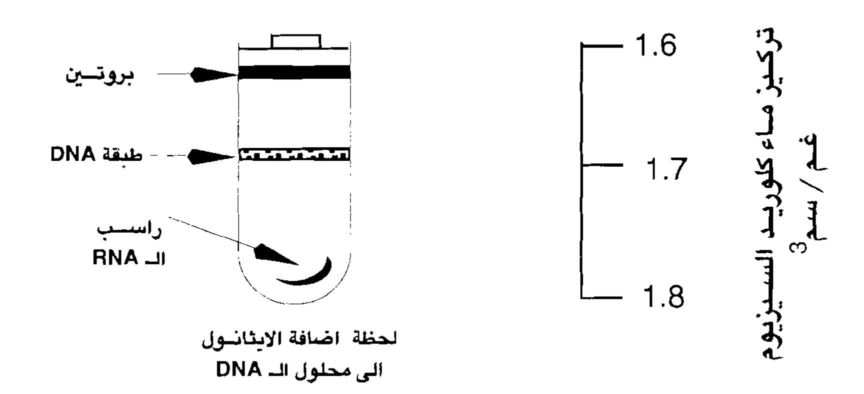
13 – اطرد الانبوبة مركزياً بقوة 4000 دوره في الدقيقة لمدة 10 دقائق .

14 – تخلص من الراشح وجفف الـ DNA بدرجة حرارة 37.5 مْ .

15 – اذب راسب الـ DNA بإضافة 200 مايكروليتر من محلول TE .

16 – احفظ نموذج الـ DNA بدرجة حرارة –20 مْ .

شكل 2 - 3 : إنبوبة الاستخلاص باستخدام كلوريد السيزيوم والطرد المركزي الفائق السـرعة .



تنقية نموذج الـ DNA من بروميد الاثيديوم :

1 - أضف محلول البيوتانول الى محلول الـ DNA خطوة 10 بحجم مساوي لحجم محلول الـ DNA . امزج جيداً بالتقليب .

2 - اطرد الانبوبة مركزياً بقوة 2000 دوره في الدقيقة لمدة 5 دقائق .

3 - تخلص من الطبقة العلوية الملونة بالأحمر وأضف حجم آخر من الكحول الى محلول الـ DNA .

4 - امزج جيداً بالتقليب واطرد الانبوبة مركزياً كما في الخطوة 2 .

5 - تخلص من طبقة الكحول (الأقل تلوناً) وأضف حجم آخر من الكحول الى محلول الـ DNA .

6 - أعد عملية غسيل نموذج الـ DNA بالكحول لعدة مرات حتى تصبح طبقة الكحول في آخر مرة غير ملونة نهائياً .

7 - استخدم محلول الـ DNA للترسيب بواسطة الكحول .

الاستخلاص الواسع لـ DNA العاثيات

1 – انقل محتويات الدوارق التي تحتوي على محاليل العاثيات (الخطوة 6 من تربية العاثيات بكميات كبيرة) الى قنينتي بيكمان Beckman حجم 250 سم^3 .

2 – أضف أنزيمات DNase I و RNase A بتركيز 1 مايكروجرام/سم^3 الى محتويات كل قنينة من قناني محاليل العاثيات .

3 – أحضن القناني بدرجة حرارة 37.5 مْ لمدة نصف ساعة .

4 – أضف لكل 50 سم^3 من محلول العاثيات 5 غرام من بولي ايثلين جلايكول PEG + 2.92 غرام من ملح كلوريد الصوديوم Nacl .

5 – أمزج جيداً حتى الذوبان التام .

6 – ضع قناني محاليل العاثيات في الثلج لمدة ساعة واحدة .

7 – اطرد القناني مركزياً بدرجة حرارة 4 مْ بقوة 4000 دوره في الدقيقة لمدة 10 دقائق في جهاز طرد مركزي J6 .

8 – تخلص من الراشح وأعد اذابة راسب العاثيات الابيض بإضافة 20 سم^3 من محلول SM + 150 مايكروليتر من محلول EDTA (0.5 M) .

9 – انقل محلول العاثيات إلى أنابيب استخلاص زجاجية صلبة نظيفة .

10 – أضف 50 مايكروليتر من محلول SDS (25%) لكل أنبوبة من أنابيب الاستخلاص . امزج جيداً بعمود زجاجي نظيف .

11 – احضن الأنابيب بدرجة حرارة 65° (حمام مائي) لمدة 5 دقائق .

12 – استخلص DNA العاثيات بطريقة الفينول : كلوروفورم .

ملاحظـــة :

يمكن استـخـلاص DNA العاثيات بطريقة الطرد المركـزي الفائق مع ملح كلوريد السيزيوم دون إضافة SDS .

13 - رسـب الــ DNA بالكحول والطرد المركـزي ، جفف ثم أذب راسب الـ DNA بإضافة 200 مايكروليتر من محلول TE .

14 - احفظ نموذج الـ DNA بدرجة حرارة - 20 مْ .

أستخلاص الـ DNA من نموذج دم

1 – انقل 5 سم3 من الدم المخلوط مع مانع التخثر إلى انبوبة استخلاص زجاجية صلبة نظيفة .

2 – اطرد الانبوبة مركزياً بقوة 4000 دوره في الدقيقة لمدة 10 دقائق .

3 – تخلص من الراشح الذي يمثل البلازما وأضف 2 سم3 من المحلول الفسلجي لغسل كريات الدم .

4 – اطرد الانبوبة مركزياً بقوة 2500 دورة في الدقيقة لمدة 5 دقائق .

6 – تخلص من الراشح وأذب راسب الكريات بإضافة 5 سم3 من الماء المقطر للتخلص من كريات الدم الحمراء .

7 – تخلص من طبقة الراشح الحمراء وأضف 10 سم3 من محلول اذابة الخلايا الدموية (ELB) Erythrocytes Lysis Buffer + 100 مايكروجرام/سم3 من محلول انزيم البروتينيز K .

8 – امزج جيداً بعمود زجاجي نظيف . احضن بدرجة حرارة 37.5 مْ في حاضنة هزازة بدرجة هز 100 دوره في الدقيقة لمدة 12 ساعة .

9 – وزع محلول الخلايا1 على قنينتي استخلاص زجاجية نظيفة .

10 – اضف 100 مايكروليتر من محلول SDS (25%) لكل أنبوبة استخلاص وامزج جيداً بعمود زجاجي نظيف .

11 – استخلص DNA خلايا الدم البيضاء بطريقة الفينول : كلوروفورم .

12 – رسب الـ DNA بالكحول واطرد مركزياً ثم جفف النموذج وأذبه بإضافة 200 مايكروليتر من محلول TE .

13 – احفظ نموذج الـ DNA بدرجة حرارة – 20 مْ .

أستخلاص الـ DNA من مزارع الدم أو نخاع العظم

1 - اطرد أنابيب محلول الخلايا (الخطوة 12 من زراعة الدم أو الخطوة 8 من زراعة نخاع العظم أو الخطوة 7 من مزارع الدم المتزامنة) مركزياً بقوة 2500 دوره في الدقيقة لمدة 10 دقائق .

2 - تخلص من الراشح وأضف 5 سم3 من الماء القطر لإذابة راسب الخلايا ، امزج جيداً لمدة دقيقتين .

3 - اطرد الأنابيب مركزياً بقوة 2500 دوره في الدقيقة لمدة 5 دقائق .

4 - تخلص من الراشح وأضف لراسب الخلايا 10سم3 من ملحول اذابة الخلايا الدموية ELB + 100 مايكروجرام/سم3 من انزيم البروتينيز K . امزج جيداً بعمود زجاجي نظيف .

5 - احضن الأنابيب عند درجة حرارة 37.5مْ في حاضنة هزازة بدرجة هز 100 دوره في الدقيقة لمدة 12 ساعة .

6 - رسب DNA الخلايا بطريقة الفينول : كلوروفورم .

7 - رسب الـ DNA بالكحول والطرد المركزي كما سبق . جفف النموذج ثم اذبه بإضافة 200 مايكروليتر من محلول TE .

8 - احفظ نموذج الـ DNA بدرجة حرارة - 20 مْ .

استخلاص الـ DNA من المزارع النسيجية

1 – أضف الى محلول الخلايا التي تم حصادها في الخطوات 18 من انشاء مزارع نسيجية من خلايا محفوظة أو الخطوة 21 من الطريقة الأولى لانشاء مزارع نسيجية من أنسجة حية أو الخطوة 20 من الطريقة الثانية لانشاء المزارع النسيجية من أنسجة حية 10 مايكروليتر من انزيم بروتينيز K (100 مايكروجرام/سم3) وامزجه جيداً .

2 – احضن الأنابيب بدرجة حرارة 37.5 مْ لمدة 1 - 3 ساعة .

3 – أضف 200 - 300 مايكروليتر من محلول SDS (25%) الى محلول الخلايا . امزج جيداً بعمود زجاجي نظيف .

4 – احضن أنابيب الاستخلاص بدرجة حرارة 65مْ (حمام مائي) لنصف ساعة .

5 – استخلص DNA الخلايا بطريقة الفينول : كلوروفورم .

6 – رسب الـ DNA كما في الطريقة الخاصة بذلك . جفف نموذج الـ DNA ثم أذبه بإضافة 200 - 400 مايكروليتر من محلول TE .

7 – احفظ نماذج الـ DNA بدرجة حرارة – 20مْ .

استخلاص الـDNA من الانسجة الحيوانية

تستخدم هذه الطريقة لإستخلاص الـ DNA من نماذج الانسجة الحية أو المجمدة أو المحفوظة بالفورمالين .

اغسل نموذج النسيج جيداً بالمحلول الفسلجي المثلج قبل بدء العمل .

1- خذ ما زنته 5 - 8 غرام من النسيج واغسله بمحلول ++MSB - Ca ثم قطعه الى قطع صغيرة ورقيقة مستخدماً شفرة جراحية حادة وقوية مع المحافظة على ترطيب النسيج بمحلول ++MsB - Ca .

2 - انقل القطع النسيجية الصغيرة الى طبق زجاجي نظيف واضف اليها 2 سم3 من محلول التربسين 0.25% واستمر في تقطيع وهرس النسيج لمدة 5 دقائق .

ملاحظـــة :

يقوم انزيم التربسين بإذابة الانسجة الرابطة بين الخلايا مما يؤدي الى تفكيك النسيج الى خلايا مفردة أو تجمعات خلوية بسيطة .

3 - انقل محلول الخطوة السابقة الى أنبوبة طرد مركزي نظيفة .

4 - اطرد الانبوبة مركزياً بدرجة 3000 دوره في الدقيقة لمدة 5 دقائق .

5 - تخلــص من الراشـــح ثم اغسل الراســب بإضافة 5 سـم3 من مـحلول ++MSB - Ca وتخلص منه بعد ذلك بالطرد المركزي كما سبق .

استخدام المجانس الزجاجي لتحطيم الخلايا :

6 - أذب راسب الخلايا بإضافة 5 سـم3 من مـحلول ++MSB - Ca وانقله الى المجانس الزجاجي Glass Dounce Homogenizer .

7 - حطم خلايا النسيج بإستخدام الذراع A عن طريق ضغط الذراع داخل فراغ المجانس نحو الاسفل وسحبها نحو الاعلى . كرر العملية 8 - 10 مرات .

8 - أعد عملية التحطيم مستخدماً الذراع B ولخمسة مرات .

ملاحظـــة :

يجب أخذ الحيطة والحذر عند إستخدام الأذرع الزجاجية إذ ان الضغط بقوة دون الانتباه قد يؤدي الى تحطم المجانس أو انكسار الذراع وما لذلك من خطورة حقيقية .

9 - اجمع محلول الخلايا الناتجة من عملية التحطيم في أنبوبة استخلاص زجاجية صلبة نظيفة . اغسل المجانس الزجاجي بواسطة 5 سم3 من محلول MSB - Ca++ وأضفه الى أنبوبة الاستخلاص . (يمكن استخدام اكثر من أنبوبة استخلاص لتجميع محلول الخلايا) .

10 - تخلص من كتل الانسجة التي ربما وجدت في المحلول بتنقية المحلول بإمراره عبر قطعة شاش طبي مبللة بمحلول MSB - EDTA .

11 - أضف محلول MSB - EDTA لكل أنبوبة من أنابيب الاستخلاص التي تحتوي محلول الخلايا حتى فوهة الأنابيب .

12 - اطرد الأنابيب مركزياً بقوة 2000 دورة في الدقيقة لمدة 10 دقائق لترسيب نوى الخلايا فقط .

13 - تخلص من الراشح (يمكن الاستفادة منه لإستخلاص DNA المايتوكوندريا) وأضف لراسب النوى 5 سم3 من محلول STE .

14 - أضف 10 مايكروليتر من انزيم بروتينيز K (100 مايكروجرام/سم3) الى محلول الخلايا . أمزج جيداً واحضن الأنابيب بدرجة 37.5 مْ لمدة 1 - 3 ساعة .

15 - أضف 200 - 300 مايكروليتر من محلول SDS (25%) الى محلول نوى الخلايا وأمزجه جيداً وبهدوء بإستخدام عمود زجاجي نظيف . احضن الأنابيب بدرجة حرارة 65مْ حمام مائي لمدة نصف ساعة .

ملاحظـة :

يصبح المحلول في هذه المرحلة لزجاً بسبب وجود الـ DNA .

16 – استخلص الـ DNA بطريقة الفينول : كلوروفورم .

17 – رسب الـ DNA بالطريقة الخاصة بذلك . جفف النموذج وأعد اذابته بإضافة 200 - 300 مايكروليتر من محلول TE .

18 – احفظ نموذج الـ DNA بدرجة حرارة – 20مْ .

استخدام المجانس الكهربائي : Electric Metal Homogenizer

اغسل المجانس من الداخل جيداً ثم جففه واحفظه بدرجة حرارة 4مْ وحضر قنينة نتروجين سائل لاستخدامها مع المجانس .

1 – اغسل النسيج جيداً بمحلول MSB - Ca++ ثم اقطعه الى قطع صغيرة مستخدماً شفرة جراحية حادة قوية مع المحافظة على ترطيب النسيج بمحلول MSB - Ca++ .

2 – انقل محلول قطع النسيج الى المجانس الكهربائي ثم أضف كمية مناسبة من النتروجين السائل وأغلق غطاء المجانس جيداً ثم قم بتدويره بسرعة عالية لمدة 60 ثانية .

3 – اجمع مسحوق النسيج من المجانس بإستخدام معلقة معدنية نظيفة وانقله الى أنبوبة طرد مركزي .

4 – اضف 5 سم3 من محلول STE الى محلول النسيج وامزجه جيداً .

5 – أضف 10 مايكروليتر من إنزيم بروتينيز K (100 مايكروجرام/سم3) الى محلول الخلايا وامزجه جيداً واحضن الانبوبة بدرجة حرارة 37.5مْ لمدة 1 - 3 ساعة .

6 – أضـف 200 - 300 مايكروليتر من محلول SDS (25%) الى محلول الخلايا وامزجه جيد بعمود زجاجي نظيف .

احضن الانبوبة في حمام مائي بدرجة 65مْ لمدة نصف ساعة .

7 – استخلص الـ DNA بطريقة الفينول : كلوروفورم .

8 – رسب الـ DNA بالكحول والطرد المركزي ثم جفف النموذج .

9 – أعد اذابة الـ DNA بإضافة 200 - 300 مايكروليتر من محلول TE واحفظه بدرجة حرارة – 20 مْ .

قياس تركيز الـ DNA في النموذج المستخلص

1 –خذ 5 مايكروليتر من محلول الـ DNA مجهول التركيز وانقله الى أنبوبة قياس Quartz cuvette .

2 – أكمل حجم السائل في أنبوبة القياس الى 1 سم3 بإضافة ماء مقطر .

3 – اضبط جهاز قياس الكثافة الضوئية بإستخدام قنينة قياس معبئة بالماء المقطر فقط .

4 – ضع أنبوبة قياس نموذج الـ DNA في جهاز قياس الكثافة الضوئية واضبط الطول الموجي عند درجة 260nm .

5 – اقرأ قيمة الكثافة الضوئية للنموذج التي تمثل تركيز الـ DNA بالمايكروجرام في مايكروليتر واحد .

حساب التركيز :

ان تركيز الـ DNA في النموذج = قراءة الجهاز x 10

فلو افترضنا بأن قيمة .O.D عند الطول الموجي 260 لنموذج الـ DNA هو 0.5 فإن النموذج الاصلي لمحلول الـ DNA (5 مايكروليتر) سوف يحتوي على 5 مايكروجرام من الـ DNA . فلو افترضنا بأن حجم محلول الـ DNA في النموذج الرئيسي هو 200 مايكروليتر فسوف يكون تركيز الـ DNA فيه يساوي $\frac{200}{5} \times 5 = 200$ مايكروجرام .

أو 1 مايكروجرام/مايكروليتر .

- أما في حالة معرفة تلوث نموذج محلول الـ DNA بالبروتين أو الـ RNA فإنه يتم قياس الكثافة الضوئية للنموذج عند طول موجي 260 و280 فإذا كانت قيمة نسبة القراءة عند 260 الى قيمة القراءة عند 280 تساوي 1.8 فإن النموذج غير ملوث أما إذا كانت اقل من 1.6 فإن نموذج الـ DNA غالباً ما يكون ملوث ويجب إعادة تنقيته .

تنقية محاليل الـ DNA الملوثــة

في حالة أن التلوث يعود لوجود البروتين أو الفينول أو الكلوروفورم فإنه يمكن بسهولة تنقية محلول الـ DNA .

تستخدم في عملية التنقية عادة اعمدة كروماتوغرافي صغيرة معبأة وجاهزة للإستخدام مثل أعمدة سفيدكس Sephadex G50 .

1 – علق العمود بإستعمال حامل حديدي وماسك خشبي أو غيره .

2 – اغسل العمود بإضافة محلول TE الى العمود ثم ازالته مرة أخرى . أعد الغسيل لثلاثة مرات .

3 – اضف نموذج محلول الـ DNA الى العمود .

4 – اضف 400 مايكروليتر من محلول TE الى العمود واترك المحلول يخرج من النهاية الضيقة للعمود .

5 – كرر عملية اضافة محلول TE لخمسة مرات .

6 – اجمع محلول TE الذي يخرج من النهاية الضيقة للعمود في كل مرة تضيف فيها محلول TE جديد .

7 – انقل المحاليل التي تم جمعها في أنبوبة واحد .

8 – رسب الـــ DNA مستخدماً الطريقة الخاصة بذلك . جفف نموذج الـ DNA وأعد اذابته بإضافة 200 مايكروليتر من محلول TE .

إضافة الى الطريقة السابقة فإن هناك طرقاً عديدة اخرى للتنقية تعتمد على محاليل جاهزة مثل طريقة Gene Clean التي توفر موادها شركة البايوتكنولوجي الامريكية .

الفصل الثالث

« إستخدام الأنزيمات لتقطيع وتحوير وتضخيم الـ DNA »

Enzymes Used in Cloning

مقدمـــة

تستخدم في عملية الهندسة الوراثية الكثير من الانزيمات . بعض هذه الانزيمات يستخدم في تقطيع الاحماض النووية DNA وأخرى في لحام قطع الـ DNA اضافة لانزيمات اخرى عديدة ذات وظائف مختلفة .

يمكن تصنيف هذه الانزيمات الى مجاميع اعتماداً على وظيفتها وهي :

1 – أنزيمات بلمرة الحامض النووي Nucleic acid Polymerases وتقوم هذه بتصنيع نسخ من الحامض النووي من خلال تصنيع السلاسل الجديدة عبر اضافة النيوكليوتيدات بعضها جنب بعض وفق قواعد معينة .

2 – أنزيمات قطع الأحماض النووية Restriction enzymes تقوم هذه الانزيمات بقطع الاحماض النووية (DNA) في مواقع محددة أو عشوائية لانتاج قطع متنوعة الطول من الحامض النووي .

3 – أنزيمات اللحام Ligases وتعمل هذه على لحام قطع الحامض النووي المتناظرة بعضها مع بعض وهي بذلك تقوم بعكس عمل الانزيمات القاطعة .

4 – أنزيمات التحوير Modifying enzyms وتعمل هذه على تحوير نهايات الحامض النووي من خلال إضافة اوحذف مجاميع كيميائية معينة .

أنزيمات بلمرة الاحماض النووية Polymerases

أولاً : أنزيمات بلمرة الحامض النووي DNA :

تقوم هذه بتصنيع نسخ جديدة من الحامض النووي DNA . هناك عدة أنواع من هذه الانزيمات استخلصت من كائنات مختلفة . بشكل عام أن أنزيمات البلمرة هذه تحتاج إلى بادئة Primer ذات نهاية هيدروكسيلية لبدء العمل وكذلك قالب من شريط مفرد من الـ DNA .

1 – أنزيم بلمرة الـ DNA البكتيري DNA Polymerase I :

يتألف هذ الانزيم من وحدتين الاولى صغيرة تعمل على تآكل شريط الـ DNA من النهاية الثالثة بإتجاه النهاية الخامسة أما الوحدة الثانية الأكبر حجماً فتقوم بنشاط البلمرة من النهاية الخامسة نحو النهاية الثالثة . يعمل هذا الانزيم المستخلص من البكتريا المعوية E. coli على قوالب DNA فقط مستخدماً بادئات مؤلفة من RNA أو DNA لكنه أكثر كفاءة بوجود بادئه DNA . في نشاط الهدم أو التآكل لوحدته الصغيرة فإن الانزيم يستطيع هدم شريط مفرد أو مزدوج من الـ DNA وإنتاج نيوكليوتيدات مفردة أو سلاسل قصيرة منها يتراوح طولها بين 3 - 10 نيوكليوتيد .

ان وجود نشاطين لهذا الانزيم يعمل على تحديد استخدامه لذلك فقد لجأ الباحثون الى فصل وحدتي هذا الانزيم . ويتوفر الان نتيجة هذا الجهد أنزيم جديد هو انزيم قطع كلينو Klenow fragment enzyme الذي يمثل وحدة البلمرة والبناء في أنزيم البلمرة الأول Pol I .

2 – أنزيم بلمرة العاثيات T_7 DNA Polymerases و T_4 :

تقوم العاثيات T4 وT7 التي تصيب البكتريا E. coli بإنتاج هذه الانزيمات وهي لا تختلف كثيراً عن أنزيم البكتريا Pol I اذ أن لها نشاط هدم وآخر للبناء . الا انها تتميز بكفاءتها وقدرتها على العمل في أسى حامضي عالي 8 - 9 مقارنة مع 7 مع أنزيم البكتريا . هذا اضافة لاختلافات اخرى .

3 – أنزيم البلمرة Taq DNA Polymerase :

تم عزل هذا الانزيم من بكتريا المياه الحارة Thermus aquaticus وهو يتميز بنشاط الهدم والبناء وكفاءته العالية في درجات الحرارة العالية 70 - 80مْ . ويتوفر الان انزيم بلمرة Taq خالي من نشاط الهدم ويستخدم كثيراً في تفاعلات سلاسل البلمرة PCR . ويذكر بأن كلٍ من نشاط البناء والهدم يبدئان من النهاية الخامسة نحو الثالثة في هذا الانزيم ذلك لفقدانه نشاط الهدم من النهاية الثالثة .

ثانياً : أنزيمات بلمرة الحامض النووي RNA :

وهي انزيمات تقوم ببناء نسخة RNA من قالب DNA دون الحاجة الى بادئة . تمتلك البكتريا عادة على نوع واحد من هذه الانزيمات لبناء جميع أنواع الحامض النووي RNA ويطلق عليه RNA Pol بينما تمتلك الاحياء حقيقية النوى ثلاثة أنزيمات . الأول RNA Pol I لبناء الحامض النووي الريبوزي الرايبوسومي r RNA (185 و 285) وال RNA Pol II لبناء الحامض النووي المرسال m RAN والثالث RNA POl III لبناء الحامض النووي الناقل t RNA والريبوسومي(55) r RNA .

اضافة لما سبق فإن هناك نوعان اخران من أنزيمات البلمرة في العاثيات . الاول هو أنزيم الاستنساخ العكسي Reverse transcriptase الذي له القابلية على بناء نسخ RNA من DNA أو العكس .

ويتوفر هذا الانزيم في معظم الفايروسات المرتدة Retroviruses والثاني هو انزيم بلمرة العاثيات وله عدة طراز منها SP6 وT3 و T7 وتتميز هذه الطرز بأن لها القدرة على بناء نسخ RNA من مزدوج DNA .

أنزيمات اللحام Ligases

تعمل هذه الانزيمات على ربط الاحماض النووية من خلال بناء أواصر الفوسفور ثنائي الاستر Phosphodiestar bonds التي تشكل العمود الفقري لهذه الاحماض . هناك ثلاثة أنزيمات للحام هي أنزيم اللحام المستخلص من بكتريا القولون E. coli DNA Ligases وآخران مستخلصان من العاثي T_4 احداهما يعمل في لحام الـ T_4 DNA Ligase وآخر T_4 RNA Ligase .

يستخدم الانزيمات DNA Ligase و T4 DNA Ligase كثيراً في عمليات لحام مقطع الـ DNA المزدوج بينما يستخدم الانزيم T4 RNA Ligase في لحام نهايات الاشرطة المفردة للـ DNA لانتاج جزيئة حلقية من الـ DNA .

انزيمات التحوير Modifying enzymes

تعمل هذه الانزيمات على تحوير النهايات الخامسة أو الثالثة لقطع الحامض النووي وكذلك يضيف بعضها عدد من النيوكليوتيدات . أهم هذه الانزيمات :

1 - الفوسفاتيز القاعدي Alkaline Phosphatase

يقوم هذا الانزيم بإزالة مجاميع الفوسفات من النهاية الخامسة في قطع الـ DNA . ويستخدم لمنع القطع من إعادة الإلتحام مرة ثانية .

2 - كاينيز متعدد النيوكليوتيدات Polynucleotidle kinase

يعيد هذ الانزيم مجاميع الفوسفات الى النهاية الخامسة لقطع الـ DNA . وهو بذلك يعمل عكس الانزيم الأول .

3 - الترانسفيريز النهائي الطرفي Terminal deoxyuncleotidyl transferase TdT

يضيف نيوكليوتيد أو أكثر للنهاية الثالثة الهيدروكسيليه من قطع الـ DNA .

أنزيمات الهدم Nucleases

وهي مجموعة كبيرة من الانزيمات التي لها القدرة على هدم الاحماض النووية بنوعيها DNA و RNA .

أولاً : أنزيمات هدم الـ RNA :

هناك عدة أنزيمات تقوم بذلك أهمها :

RNase H المعزول من بكتريا القولون E.coli .

RNase A المعزول من البنكرياس البقري .

RNase T1 و T2 المعزول من الفطر أسبرجلس A. oryzae .

ثانياً : أنزيمات هدم الـ DNA :

إضافة لنشاط الهدم في أنزيمات البلمرة التي سبق الحديث عنها فإن هناك أنزيمات مستقلة أخرى تعمل على هدم الـ DNA منها :

DNase I المعزول من البنكرياس البقري.

S1 nuclease المعزول من الفطر أسبرجلس .

Exnuclease III المعزول من بكتريا القولون .

Restriction enzymes الانزيمات القاطعة المعزولة من بكتريا القولون وتعتبر هذه من أهم مجاميع هدم الـ DNA .

هناك ثلاثة أنواع من أنزيمات القطع هي :

الطراز الأول Type I والطراز الثاني Type II والطراز الثالث Type III . ويُعتبر الطراز الثاني من هذه الانزيمات من أهمها وسيتم الحديث عنها كثيراً خلال هذا الفصل وغيره .

أنزيمات القطع من الطراز الثاني
Type II Restriction enzymes

تعمل هذه الانزيمات على القطع الداخلي للسلاسل المزدوجة من الـ DNA تتميز هذه الانزيمات بقدرتها الدقيقة على القطع من أماكن معينة دون غيرها . لذلك فإن لكل أنزيم من هذا الطراز مواقع معينة مميزة يعمل عندها (جدول 3 - 1) . ونتيجة لهذا التخصص في العمل فإنه من الممكن معرفة الخريطة الانزيمية وعدد القطع الناتجة من كل شريط DNA (جدول 3 - 2) .

تختلف طبيعة القطع الناتجة من استخدام هذه الانزيمات ، فبعضها يكون ذات نهايات لزجة Cohesive or Sticky ends وبعض الانزيمات تنتج قطعاً ذات نهاية غير لزجة أو عمياء Blunt ends .

5⁻ G↓AATTC ⁻3	Eco R1	5 - G + AATTC - ⁻3
⁻3 C TTAAG↑ ⁻5		3- CTTAA + G - ⁻5

نهايات لزجة

-5 GG↓CC-3	Hae III	-5 - GG + CC - 3⁻
⁻3 CC↑GG ⁻5		⁻3 - CC + GG - ⁻5

نهايات عمياء

جدول 3 - 1 : عدد من الانزيمات القاطعة ومواقع القطع الخاصة بكل منها .

الإنـــزيم	موقع القطع
Eco R1	G↓AATTC
Bam H1	G↓GATCC
Hind III	A↓AGCTT
Hpa I	C↓CGC
Mbo 1	↓GATC
Pst 1	CTGCA↓G
Pvu II	CAG↓CTG
Sau 3A	GATC
Xho I	C↓TCGAG
Xba I	T↓CTAGA

تحتاج معظم التفاعلات الانزيمية الى وسط مناسب يعمل على توفير ظروف جيدة تؤدي الى نجاح التفاعل . وتشترك معظم الانزيمات القاطعة في الكثير من ظروف تفاعلاتها . الجدول التالي يبين أنواع المحاليل الدارئة Buffers المناسبة لمعظم هذه الانزيمات .

جدول 3 - 2 : المحاليل الدارئة المستخدمة مع معظم أنزيمات القطع .

نوع المحلول X10	Tris - cl	Mgcl2	Nacl	Kcl	DTT	PH
Low (L)	100 mM	100 mM	0.5M	____	10 mM	7.4
Medium (M)	100 mM	100 mM	IM	____	10 mM	7.4
High (H)	100 mM	100 mM	1.5M	____	10 mM	7.4
K	100 mM	100 mM	____	200 mM	____	8.0
O	100 mM	100 mM	____	____	10 mM	7.4

تحضير تفاعل الإنزيمات القاطعة

1 - في أنبوبة أبندروف معقمة أضف 10 مايكروجرام من محلول الـ DNA .

2 - أضف 2 مايكروليتر من المحلول الدارىء المناسب للإنزيم .

3 - أضف 10 - 20 وحدة من الانزيم .

4 - اكمل حجم التفاعل الى 20 مايكروليتر بإضافة الماء المقطر المعقم أو محلول TE .

5 - أمزج التفاعل جيداً ثم احضن بالدرجة الحرارية المناسبة لفترة 1 - 2 ساعة .

6 - تأكد من نجاح التفاعل بأخذ 1 مايكروليتر من محلول التفاعل وتحليلها عن طريق الهجرة الكهربائية عير هلام .

> **ملاحظـــة :**
>
> التفاعل ناجح في حالة الحصول على مسحه طويلة من الـ DNA أو عدة حزم . أما في حالة الفشل فتجد حزمة واحدة في قاعدة الهلام .

الخرائط الانزيميـــة :

نظراً لاختـلاف مـواقع قطع الانزيمات القـاطعـة على تردد الحامض النووي لذلك فإنه بالإمكان تحديد عدد القطع الناتجة من معاملة DNA معين مع كل انزيم بإستخدام الهجرة الكهربائية عبر هلام .

ان تلك الحقيقة اتاحت للعلماء فرصة بناء خرائط أنزيمية لعدد كبير من الانزيمات لمجموعة ليست قليلة من الجينات Genomes .

لأجل بناء خريطة أنزيمية لجين معين أتبع الخطوات التالية :

لنفترض بأن الجين المطلوب تحديد خريطة الانزيمات Sau 3A و Bam H1 و Pvu II له مؤلف من 20 كيلو قاعدة DNA حلقي .

1 – جهز تفاعل مع كل من الانزيمات Sau 3A و Bam H1 و Pvu II كل على انفراد (أنظر طريقة تحضير التفاعل الانزيمي كما سبق) .

2 – حلل تفاعل كل انزيم بإستخدام الهجرة الكهربائية عبر الهلام .

3 – جهز تفاعلات مزدوجة كالتالي

Bam H1 + Sau 3A

Pvu II + Sau 3A

Pvu II + Bam H1

ملاحظـــة :

يمكن اجراء التفاعل المزدوج بإضافة الانزيمين سوية في حالة تشابه احتياجاتها من المحلول الداريء ودرجة الحرارة . أما في حالة الاختلاف ظروفها فيتم اجراء التفاعل الأول ثم تنقية الـ DNA ومن ثم اجـراء التفاعل الثاني .

4 – حلل نتائج التفاعلات المزدوجة عن طريق الهجرة الكهربائية عبر هلام .

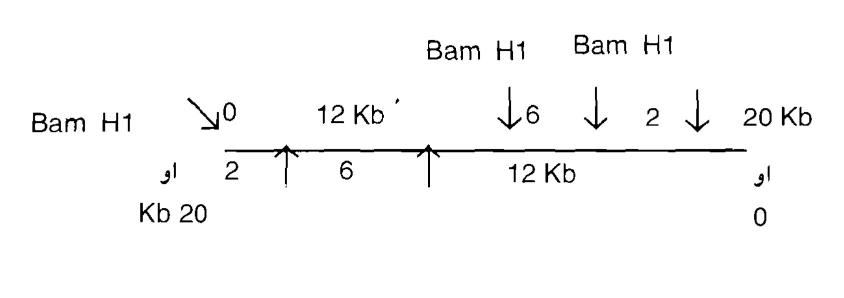
تحليل نتائج تفاعلات الخريطة الانزيمية :

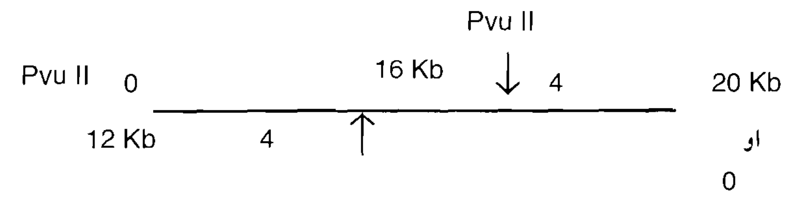
ولنفترض بأنه تم الحصول على النتائج التالية :

نـــوع التفاعـــل	عدد وحجم القطع الناتجة Kb
Sau 3A	20
Bam H1	12 6 2
Pvu II	16 4
Sau 3A + Bam H1	11 6 2 1
Sau 3A + Pvu II	8.5 7.5 4
Pvu II + Bam H1	9.5 4.5 2.5 1 1.5

الخريطة الانزيمية للتفاعلات المفردة :





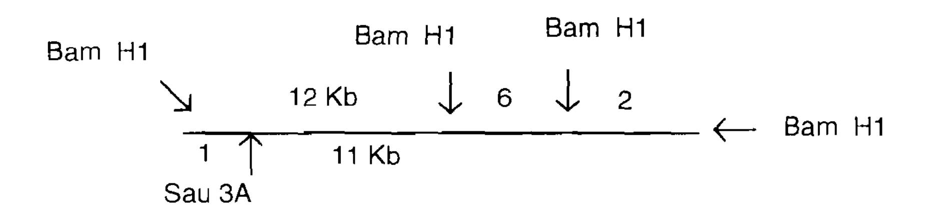


الخريطة الانزيمية للتفاعلات المزدوجة :

1 - تفاعل Sau 3A + Bam H1 :

من مقارنة نتائج التفاعلات المفردة لهذه الانزيمات ونتائج التفاعل المزدوج لهما سنجد أن الخريطة الانزيمية ستكون كالتالي :

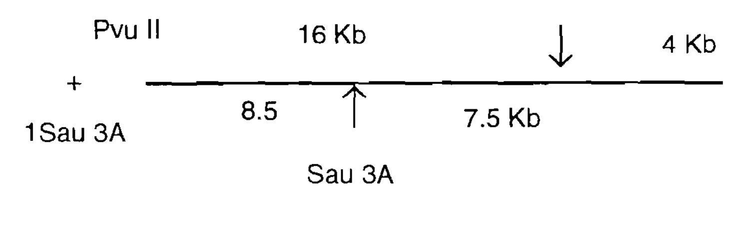
> **ملاحظـة :**
>
> ان نتائج التفاعل المزدوج تبين أن هناك موقعاً مفرداً للإنزيم Sau 3A يقع على القطعة 12 Kb الناتجة من تفاعل Bam H1 بينما لا تمتلك القطعتان 6 Kb و 2 Kb الناتجة من تفاعل الانزيم Bam H1 أية مواقع للإنزيم Sau 3A .



2 - تفاعل Sau 3A + Pvu II :

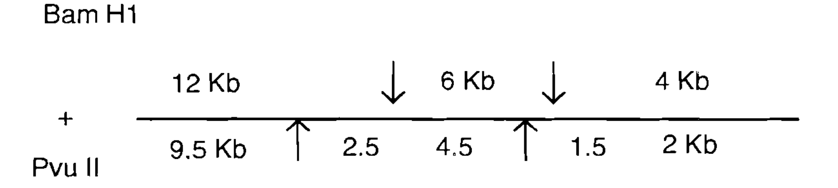
من مقارنة نتائج التفاعلات المفردة لهذه الانزيمات ونتائج التفاعل المزدوج لهما سنجد ما يلي :

أن الموقع المفرد لقطع الانزيم Sau 3A يقع على القطعة الطويلة 16 Kb الناتجة من تفاعل الانزيم المفرد Pvu II .

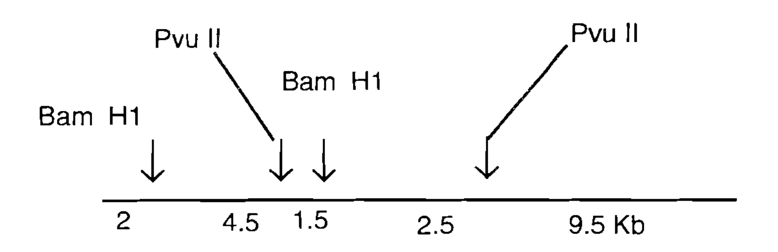


3 – تفاعل Bam H1 + Pvu II :

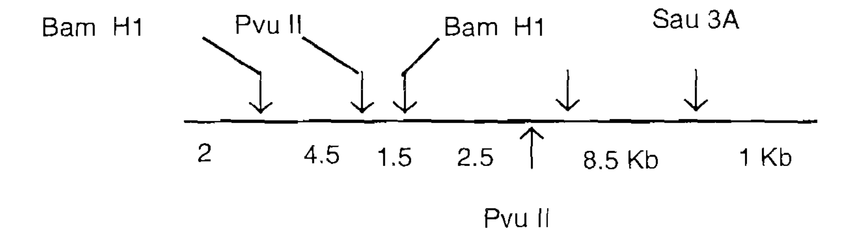
من مقارنة نتائج التفاعلات المفردة لهذه الانزيمات مع نتائج التفاعل المزدوج نلاحظ أن هناك موقعي قطع لأنزيم Pvu II يقع الأول على القطعة 8 Kb الناتجة من تفاعل الانزيم Bam H1 (ويقطعها الى قطعتين هم 9.5 و 2.5 كيلو قاعدة) والموقع الثاني يقع على القطعة 6 Kb الناتجة من تفاعل الانزيم Bam H1 (ويقطعها الى قطعتين هما 4.5 و 1.5 كيلو قاعدة) لذلك فالخريطة الانزيمية لهذا التفاعل هي :



وبما ان الانزيم Pvu II يشطر البلازميد الى قطعتين هما 16 Kb و 4 Kb لذلك فان الخريطة الانزيمية لهذين الانزيمين هي :



4 – يتم تعيين موقع قطع الانزيم Sau 3A من مقارنة نتائج التفاعلات المزدوجة التي يشترك فيها وتفاعلة المنفرد ولذلك سوف تكون الخريطة الانزيمية للـ DNA الحلقي المفترض كالتالي :



وفي حالات معينة من تحديد الخرائط الانزيمية فانه يتم اللجوء الى تفاعل جزئي لأحد الانزيمات . التفاعل الجزئي هو عدم اعطاء كامل الفرصة للانزيم لتقطيع الـ DNA بحضانة التفاعل لفترة قصيرة او وضع كمية قليلة من الانزيم .

تفاعل سلسلة البوليميرز Polymerase Chain Reaction (PCR)

لقد أستعيضت عملية تضخيم قطع DNA معينة أو مورثات معينة التي كانت تجـرى اربط هذه القطع مع بلازميد أو عاثي ثم مضاعفتها داخل البكتريا بطريقة جديدة كلياً وهي تفاعل سلسلة البوليميريز PCR . وأصبح الان وبإستخدام هذه الطريقة تضخيم المورثات الى ملايين النسخ دون الحاجة الى اتباع أسلوب الكلونة العام .

يعتمد هذا التفاعل على وجود نسخ مفردة من تردد الـ DNA المراد تضخيمه اضافة الى بادئة خاصة به وأنزيم بلمرة DNA . يعتبر أنزيم البلمرة Taq من أفضل الانزيمات المستخدمة في هذه العملية نظراً لقابليته العالية على البلمرة بدرجات حرارة عالية واستقراريته بدرجات الحرارة التي تتراوح بين 94 - 95 مْ المستخدمة في فصل الاشرطة المزدوجة . وأصبح اجراء هذا التفاعل لا يحتاج الكثير من الجهود نظراً لتوفر الانزيم والبفر اضافة لانواع مختلفة من البادئات التي تناسب تضخيم عدد كبير من المورثات . والأكثر من ذلك توفر الاجهزة الكهربائية التي تعمل ذاتياً بحيث أن عملية التضخيم لا تحتاج سوى تحضـ التفاعل ووضعه في الجهاز بعد برمجته ليعمل بعد ذلك ذاتياً في توفير ظروف التفاعل وفصل الاشرطة المزدوجة .

وأصبحت حساسية هذا التفاعل عالية جداً حيث يمكن اجراءه على نسخة واحدة فقط كقالب . كما يمكن استخدامه لتضخيم قطعة DNA معينة في خلية واحدة كما يحصل في تحديد جنس الجنين أو استخدامه في التضخيم على التحضيرات النسيجية مباشرة .

ونتيجة لأهمية هذا التفاعل أصبح من التفاعلات المهمة التي يجب توفيرها في جميع مختبرات الوراثة الجزيئية والهندسة الوراثية .

لهذا التفاعل تطبيقات عديدة منها تحديد جنس الأجنة بإستخدام بادئات خاصة لمواقع معينة على كروموسوم Y أو تحديد وجود عيوب وراثية مثل الطفرات الوراثية أو الانتقالات الكروموسومية المعروفة وغيرها . هذا عدا استخدامه في تهيئة المجسات اللازمة في عمليات الهندسة الوراثية وغيرها .

آليـــة تفاعل PCR :

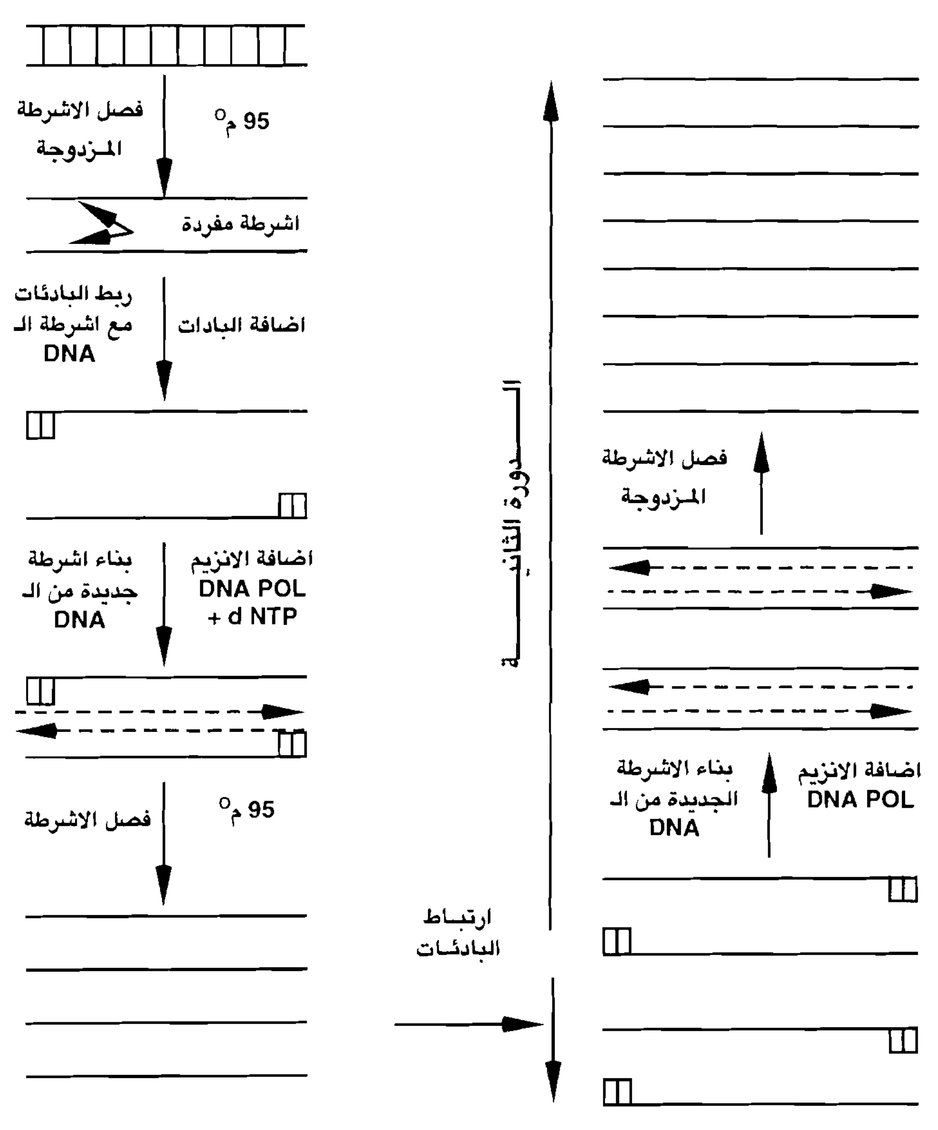
كما قلنا سابقاً فإن هذا التفاعل يستهدف تضخيم قطعة DNA معينة . لذلك فإن هذا التفاعل يحتاج الى قالب مفرد من شريط الـ DNA وبادئة معينة اضافة للانزيم Taq وبفره والنيوكليوتيدات المعروفة dNTP وتوفير ظروف معينة .

يبدأ التفاعل بإلتصاق البادئات في النهايات الثالثة والخامسة في الموقع المطلوب تضخيمه ثم بدء عملية بناء نسخ للموقع المطلوب عن طريقة اضافة النيوكليوتيدات الى البادئات وربطها مع بعضها . في نهاية الدورة الاولى من التفاعل فإنه سينتج لدينا أشرطة مزدوجة في الموقع المعين . لذلك فإنه يجب فصل هذه الأشرطة للحصول على أشرطة مفردة مرة أخرى . يتم ذلك عن طريق استخدام درجات حرارية عالية 94 - 95 مْ لفترة محددة يتم بعدها تخفيض درجة الحرارة الى الدرجة المناسبة لبدء تفاعل البناء مرة أخرى لانتاج أشرطة جديدة لنفس الموقع . وهكذا يتم بناء الأشرطة ثم فصلها واستخدامها كقوالب لبناء أشرطة جديدة وهكذا . وفي كل مرة يتم فيها التفاعل وثم فصل الأشرطة تتضاعف عدد نسخ الموقع حتى الحصول على العدد المطلوب اعتماداً على عدد دورات التفاعل (شكل 3 - 1) .

في حالة الحاجة الى الحصول على مجس موسم اشعاعياً فإنه يضاف نيوكليوتيد واحد أو أكثر موسم اشعاعياً (^{32}p dCTP مثلاً) . يدخل النيوكليتويد الموسم اشعاعياً في التفاعل معطياً اشرطة تمثل الموقع المعني ولكنها موسم اشعاعياً .

ملاحظـــة :

القطع الناتجة من تفاعل PCR تكون ذات نهايات عمياء والنهاية الخامسة لها تخلو من مجموعة الفوسفات . لذلك فإنه يجب تحوير النهايات وإضافة الفوسفات قبل استخدامها في الكلونة مع ناقل .



شكل 3 - 1 تخطيط لدورتين من دورات تفاعل PCR .

محاليـــــل :

محلول دارىء لانزيم X10 T4 Kinase :

Tris - cl	mM	500
Mgcl2	mM	100
ETT	mM	50
ATP	mM	10
		PH 7.4

محلول دارىء لانزيم X10 Taq Polymerase :

Tris - cl	mM	100
Kcl	mM	500
Mgcl2	mM	15
Gelatin		%0.01
		PH 8.3

أنزيمـــــات :

T4 Polynucleotide Kinase

Taq DNA Polymerase

اجراء تفاعل PCR مع ناقل هجين:

في هذا التفاعل يتم تضخيم قطعة الـ DNA المهندسة الى الناقل دون الحاجة الى ادخال الناقل الهجين الى خلايا مضيف كما هي العادة .

يتوفر العديد من أنواع البادئات التي تناسب نواقل مختلفة . لذلك فإن يجب اختيار البادئات المناسبة الخاصة بالناقل . ولنفترض أن الناقل الهجين هو العائي M 13 mp لذلك فإن البادئات المناسبة هي :

البادئة 1 5' - CGCC A G G GT T T T C C C A GT CA C G A C - 3'

البادئة 2 5' - AGCGGATAACAA T T T C A C A C A G G A - 3'

1 – حضر التفاعل التالي في أنبوبة مناسبة :

10	مايكروليتر	محلول الناقل الهجين
1	مايكروليتر	بادئة رقم 1 150 نانوجرام/مايكروليتر .
1	مايكروليتر	بادئة رقم 2 150 نانوجرام/مايكروليتر .
10	مايكروليتر	محلول داريء Taq x 10
8	مايكروليتر	خليط نيوكليوتيدات d NTP .
1	مايكروليتر	أنزيم البلمرة Taq (5 وحدات) .
96	مايكروليتر	مـاء مقطـر .

2 – أمزج خليط التفاعل جيداً وأضف 30 مايكروليتر زيت معدني Mineral Oil لتغطية التفاعل لمنع تبخر السوائل أثناء الحضانة .

3 – اضبط جهاز الدورة الحرارية Thermal Cycler عند درجة حرارة 94 - 95 مْ لمدة 40 ثانية و 50مْ لمدة دقيقة و70 - 72 مْ لمدة 2 دقيقة وثبت كذلك عدد الدورات المطلوبة .

ملاحظــة :

في حالة عدم وجود جهاز دوره حرارية مبرمج يتم تجزئة درجات الحرارة .

4 - ضع أنبوبة التفاعل في جهاز الدورة الحرارية حتى نهاية الدورات الحرارية .

5 - أحضن التفاعل مرة أخرى بدرجة حرارة 72مْ لمدة خمسة دقائق لاتاحة الفرصة لانزيم البلمرة لملأ أية ثغرات موجودة في النسخ الجديدة .

6 - تأكد من نجاح التفاعل بإجراء الهجرة الكهربائية لـ 2 مايكروليتر من محلول التفاعل عبر الهلام .

ملاحظــة :

وجود حزمة بحجم مساوي لحجم القطعة المهندسة الى الناقل دلالة على نجاح التفاعل . . هناك حزم إضافية إحداها يمثل الناقل الهجين (ثقيلة) والاخرى خفيفة تمثل البادئات غير المرتبطة (في حالة وجودها) وقد تختفي هذه من الهجرة نظراً لسرعة هجرتها الشديدة عير الهلام أو عدم وجودها أصلاً .

اجراء تفاعل PCR مع قطع DNA مختلفة :

يمكن تضخيم قطع DNA مختلفة بإستخدام تفاعل PCR بإستخدام بادئات معينة تمثل في حقيقة الأمر قطع عمياء مصنعة مختبرياً مزدوجة . يتم في هذا الاختبار لحام البادئات بعد اضافة مجاميع فوسفات لنهاياتها الى قطع الـ DNA المطلوب تضخيمها ثم اجراء تفاعل الـ PCR .

ولنفترض بأن القطع المطلوب تضخيمها تعود للبلازميد PBR 322 المقطع بالانزيم Hae III أو أي نموذج DNA مقطع بإنزيم معين . يفترض أولاً تنقية قطع الـ DNA هذه بعد التفاعل مع الانزيم القاطع بطريقة الفينول : كلوروفورم والترسيب في الكحول .

البادئات اللازمة في العمل :

الأولى : 1 ‎5- AGCTAGAATTCGGTACCGTCGACC - 3-‎

الثانية : 2 ‎5- GGTCGACGGTACCGAATTCT - 3-‎

أولاً : أضافة مجاميع فوسفات للنهايات الخامسة للبادئة رقم 2 :

أجري التفاعل التالي في أنبوبة تفاعل :

20 مايكروليتر محلول البادئة الثانية القصيرة 1 مايكروجرام/مايكروليتر .

3 مايكروليتر محلول دارىء للانزيم X 10 T4 Kinase .

5 مايكروليتر أنزيم التحوير T4 Kinase .

أحضن أنبوبة التفاعل بدرجة حرارة 37.5مْ لمدة ساعة واحدة ثم بدرجة حرارة 95مْ لمدة 5 دقيقة .

ثانياً : ربط البادئات مع بعضها حسب التفاعل التالي (لإنتاج قطع عمياء) :

24 مايكروليتر من التفاعل السابق .

28 مايكروليتر محلول البادئة رقم 1 .

2 مايكروليتر محلول دارىء للأنزيم x10 T4 Kinase

أحضن أنبوبة المحلول بدرجة حرارة 90مْ لمدة 2 دقيقة ثم أترك الأنبوبة تبرد بدرجة حرارة الغرفة .

ثالثاً : ربط القطع العمياء مع قطع الـ DNA :

أجري التفاعل التالي في أنبوبة تفاعل :

10 نانوجرام من قطع البلازميد

1 مايكروليتر من البادئة المزدوجة (القطع العمياء) .

1 مايكروليتر محلول دارىء للانزيم X 10 T4 Kinase .

2 مايكروليتر	أنزيم اللحام T4 Ligase (10 وحدات) .

5 مايكروليتر	ماء مقطر معقم .

أحضن التفاعل بدرجة حرارة 14مْ لمدة 12 - 18 ساعة ثم بدرجة حرارة 70مْ لمدة 10 دقائق .

رابعاً : تنقية قطع DNA البلازميد المرتبطة مع القطع العمياء :

أعمل على تنقية قطع DNA البلازميد المرتبطة مع القطع العمياء من خلال استخدام الهجرة الكهربائية وتقطيع مواقع الحزم المطلوبة ثم معاملتها بأنزيم الأجاريز Agarase والفينول : كلوروفوم لأجل الاستخلاص .

ملاحظــة :
يمكن استخدام الاعمدة في التنقية أيضاً أو أية طريقة أخرى متوفرة .

خامساً : تفاعل PCR

1 – حضر التفاعل التالي في أنبوبة مناسبة :

50 مايكروليتر	محلول قطع البلازميد المرتبطة مع القطع العمياء .

1 مايكروليتر	محلول البادئة الطويلة رقم 1 .

10 مايكروليتر	محلول دارىء للأنزيم البلمرة x10 Taq .

8 مايكروليتر	محلول النيوكليوتيدات d NTP .

30 مايكروليتر	ماء مقطر معقم .

1 مايكروليتر	أنزيم البلمرة Taq (خمسة وحدات) .

أضف 30 مايكروليتر من الزيت المعدني لتغطية سطح التفاعل .

2 – أضبط جهاز الدورة الحرارية عند درجة حرارة 94 - 95 مْ لمدة 40 ثانية ، 50 مْ لمدة دقيقة و 70 – 72 مْ لمدة 2 دقيقة وثبت كذلك عدد الدورات المطلوبة .

3 – ضع أنبوبة التفاعل في الجهاز حتى نهاية الدورات الحرارية .

4 - أحضن التفاعل مرة أخرى بدرجة حرارة 72 لمدة خمسة دقائق .

5 - تأكد من نجاح التفاعل بإجراء الهجرة الكهربائية عبر الهلام .

ملاحظـة :

وجود عدد من الحزم مساوي لعدد حزم البلازميد المعامل بالانزيم القاطع وأكبر حجماً (أضف طول النهايات العمياء الى القطع لتحصل على الحجم الحقيقي) .

الفصل الرابع

الهجرة الكهربائية عبر هلام

Gel Electrophoresis

محاليل

1 – محلول 10 x TEA :

0.4	M	Tris - cl
0.2	M	Sodium acetate
0.02	M	EDTA
0.18	M	Nacl

+ لتر ماء مقطر - PH 8.0

2 – محلول تحميل 10 x Loading buffer :

%50	Glycerol
%5	Bromophenol
%5	SDS
%40	ماء مقطر

3 – محلول أمونيوم بيرسلفيت 3%

0.3	غرام	Ammonium persulphate
10	سم3	ماء مقطر

4 – محلول تظهير هلام الاكريلمايد Developer Solution :

10	غرام	Sodium carbonate
474	سم3	ماء مقطر
2.5	سم3	فورمالين

يتم تحضيره قبل فترة قصيرة من استعماله .

5 – محلول CTAB (1 ملغرام/سم3) :

100 ملغرام Hexadecyl trimethyl ammonium bromide

100 سم3 ماء مقطر .

6 – بروميد الاثيديوم (10 ملغرام/سم3) :

10 ملغرام Ethidum Bromide

10 سم3 ماء مقطر .

أحفظ المحلول في قنينة معتمة . يرجى الانتباه إلى أن مادة بروميد الاثيديوم من المواد المسرطنة الخطرة .

7 – محلول الاكريلمايد 30% :

29 غرام Acrylamide

1 غرام N,N, methylene biscrylamide

100 سم3 ماء مقطر

8 – TEMED :

محلول جاهز .

9 – محلول نترات الفضة 0.5% :

0.5 غرام Silver nitrate

100 سم3 ماء مقطر .

أحفظ المحلول في زجاجة غامقة أو معتمة .

10 – أمونيا 1% .

11 – جليسرول 2% .

مقــدمة

ان تقطيع نماذج الـ DNA الكبيرة الحجم بالانزيمات القاطعة يؤدي الى الحصول على أعداد مختلفة الحجم من القطع . لذلك فإنه يتوجب فصل هذه القطع اعتماداً على حجمها لاختيار المناسب منها في أعمال الهندسة الوراثية أو التعرف عليها جميعاً لبناء فكرة عن الخريطة الانزيمية أو لأهداف أخرى .

تعتبر الهجرة الكهربائية أفضل طريقة لتحقيق فصل قطع الـ DNA . وتعتمد هذه الطريقة على وجود الشحنة السالبة في الـ DNA مما يؤدي إلى هجرته الى القطب الموجب عند وجوده في حقل كهربائي . ان وجود قطع مختلفة الحجم سوف يؤدي الى انفصال هذه القطع اعتماداً على سرعة هجرتها في الحقل الكهربائي . وكلما كانت القطع صغيرة الحجم كانت أسرع حركة مقارنة بسرعة هجرة القطع الكبيرة الحجم أو المتوسطة الحجم .

ان الهجرة الكهربائية لقطع الـ DNA تحتاج الى سط مناسب تتمكن من خلاله هذه القطع بالهجرة دون ضياعها في المحلول الملحي المستخدم في الهجرة الكهربائية . يعتبر هلام الأجاروز والبولي اكريلمايد من أفضل الأوساط المستخدمة في الهجرة الكهربائية . يختلف استخدام هذه الأوساط اعتماداً على حجم قطع الـ DNA المراد فصلها . فمثلاً يستخدم هلام الاجاروز لفصل قطع الـ DNA الكبيرة والتي تتراوح في الحجم ما بين 1 - 50 كيلو قاعدة ذلك لأن المسامات الموجودة بين جزيئات هلام الأجاروز كبيرة الحجم مما يسمح لقطع الـ DNA الصغيرة الحجم بالحركة سريعاً والخروج من الهلام خلال فترة وجيزة بينما تستغرق القطع الكبيرة الحجم وقتاً طويلاً للحركة بسبب حجمها .

لذلك فإنه من المفضل استخدام هلام البولي اكريلمايد لفصل القطع صغيرة الحجم لوجود مسامات صغيرة الحجم بين جزيئاته مما يعرقل سير القطع الصغيرة خلاله .

تحضير هلام الاجاروز 0.8% :

1 – جهز صفيحة الهلام البلاستيكية Gel former عن طريق لصق شريط لاصق في النهايات المفتوحة وتثبيت المشط الخاص في الموقع المحدد لذلك على الصفيحة .

2 – حضر ما يلي في دورق زجاجي حجم 50 سم3 :

0.4 غرام أجاروز .

50 سم3 محلول 1x TEA

3 – سخن الدورق حتى ذوبان الاجاروز .

4 – اغلي محتويات الدورق في فرن أمواج قصيرة MIcrowave Oven .

5 – برد دورق الهلام حتى درجة حرارة 50 - 55مْ عن طريق تعريض الدورق لجريان الماء .

6 – أفرغ محتويات الدورق فوق صفيحة الهلام البلاستيكية .

7 – أترك الصفيحة دون تحريك لمدة 30 - 60 دقيقة حتى تصلب الهلام ، يمكن نقلها بعد ذلك الى درجة حرارة 4مْ لمدة ساعة .

8 – أزل الأشرطة اللاصقة والمشط بهدوء دون الاضرار في الهلام .

9 – الهلام جاهز الان للاستخدام .

ملاحظـــة :
يمكن كذلك تحضير هلام الأجاروز للحصول على هلام صغير الحجم .

الهجرة الكهربائية بإستخدام هلام الأجاروز :

1 – ضع كمية مناسبة من المحلول 1x TEA في حاوية الهجرة

الكهربائية Electrophoresis Tank .

2 - ضع صفيحة الهلام (مع الهلام) على المكان المخصص لها في حاوية الهجرة .

3 - أخلط محلول الـ DNA المراد تحليله مع 2 مايكروليتر من محلول التحميل 10x Loading Buffer .

4 - بإستخدام ماصة ضع نموذج الـ DNA في الحفرة الخاصة به في الهلام .

ملاحظة :
يجب استخدام قطع DNA قياسية Marker مثل Hind III fragments أو غيرها لتحديد حجم قطع الـ DNA في النموذج المجهول . لذلك ضع نموذج DNA قياسي ممزوج مع محلول تحميل في حفرة أخرى بجانب نموذج الـ DNA المجهول .

5 - أغلق جهاز الهجرة الكهربائية وتجنب رج المحلول داخل حاوية الهجرة .

6 - أفتح التيار الكهربائي وأضبطه بحيث يكون التيار بقوة 100 فولت لمدة 4 - 6 ساعة أو 30 فولت لمدة 16 ساعة .

7 - بعد نهاية فترة الهجرة الكهربائية أغلق التيار الكهربائي وأحرص على إزالة الاقطاب الكهربائية من حاوية الهجرة .

8 - أضف محلول بروميد الاثيديوم Ethidium Bromide بتركيز 0.5 مايكروجرام/سم^3 الى محلول الهجرة الكهربائية .

أترك الهلام في المحلول لمدة 1 - 2 ساعة .

9 - أفحص نتائج الهجرة الكهربائية بنقل الهلام مع صفيحته الى جهاز الأشعة فوق البنفسجية .

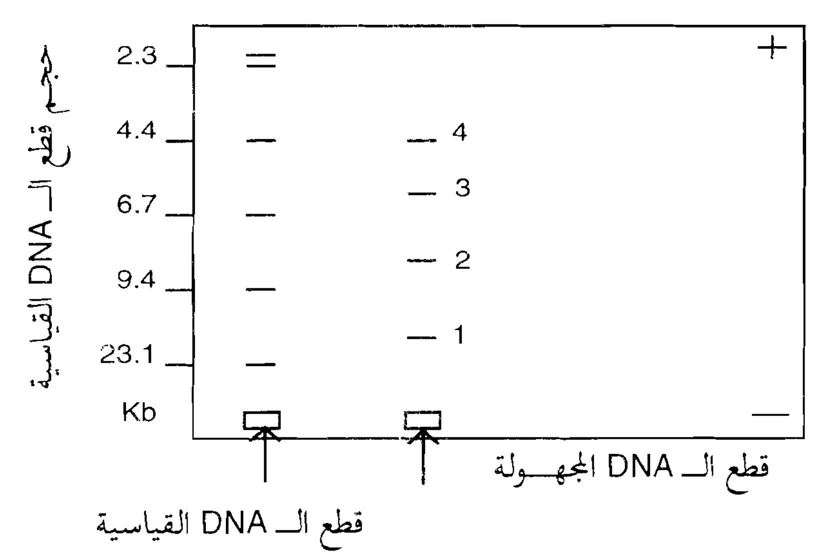
ملاحظـــة :

يمكن إضافة بروميد الاثيديوم الى محلول الهجرة الكهربائية قبل البدء بالهجرة وقبل فتح التيار الكهربائي .

تحديد الاوزان الجزيئية لقطع DNA مجهولة :

يمكن تحديد الأوزان الجزيئية بشكل شبه مضبوط لقطع DNA مجهولة بإستخدام قطع DNA قياسية معرورفة الاوزان الجزيئية والقيام بالهجرة الكهربائية كما سبق .

لنفترض بأن قطع الـ DNA القياسية المستخدمة تعود للعاثي لا مبدأ المعامل بالانزيم القاطع Lambda Hind III fragments وأن عدد القطع المجهولة كان أربعة قطع توزعت بعد الهجرة الكهربائية كما هو الحال في الشكل التالي :



الآن :

1 - على ورقة خطوط بيانية ارسم محور عمودي يمثل لوغاريتم حجم قطع الـ DNA القياســـية . ومحور أفقي يمثل المسافة التي قطعتها كل قطعة من الـ DNA القياسي .

2 - ارسم خطوط متقاطعة لكل مقلوب لوغارتمي مع المسافة الخاصة به .

> **ملاحظـــة :**
>
> استخدم مسطرة عادية لتحديد المسافة التي تقطعها كل قطعة DNA مــن النموذج المجهول والقياسي وتثبيتها على المحور الافقي .
>
> ※ حساب المسافة اعتباراً من الحفرة .

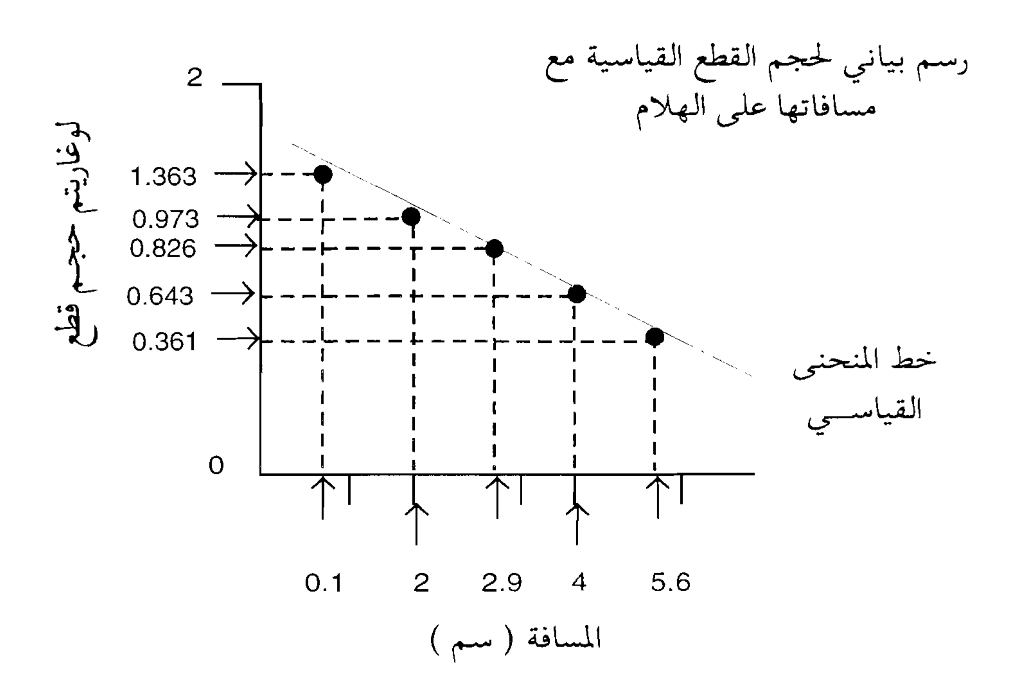
لنفترض بأن المسافات كانت كالتالي :

1 - نموذج الـ DNA القياســي :

حجم القطعة kb	المسافة التي قطعتها (سم)
23.1	0.7
9.4	2
6.7	2.9
4.4	4
2.3	5.6

2 - نموذج الـ DNA المجهول

رقــم القطعة	المسافة (سم)
1	1.4
2	2.5
3	3.4
4	4


رسم بياني لحجم القطع القياسية مع
مسافاتها على الهلام
لوغاريتم حجم قطع
2
1.363
0.973
0.826
0.643
0.361
0
خط المنحنى
القياسـي
0.1
2
2.9
4
5.6
المسافة (سم)

3 – بعد رسم المنحنى الخاص بقطع الـ DNA القياسية ثبت مسافة كل قطعة مجهولة على المنحنى الافقي الخاص بذلك .

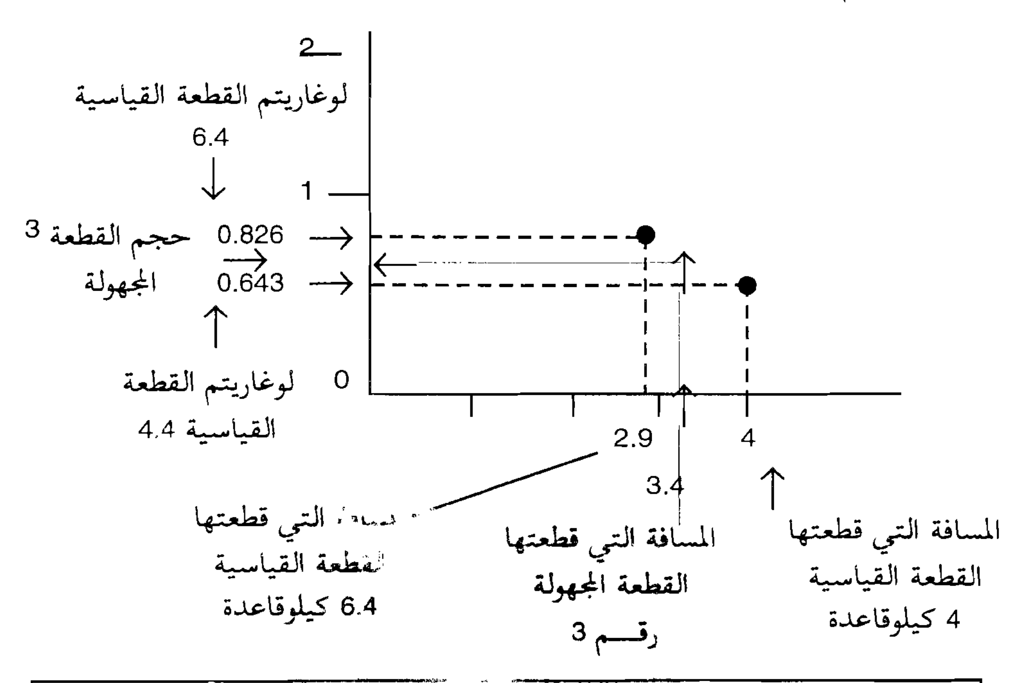
4 – ارسم خط من النقطة التي تمثل مسافة كل قطعة مجهولة عمودياً حتى تقاطعه مع المنحنى القياسي ثم ارسم من نقطة تقاطع هذه الاعمدة خطأ أفقياً نحو عمود حجم القطع .

5 – احسب لوغاريتم كل قطعة مجهولة من خلال نقطة التقاء الافقي لها مع عمود حجم القطع .

مثـــال :

القطعــة رقم 4 المجهولة = 4.4 كيلو قاعدة kb لتساوي المسافة التي قطعتها خلال الهلام مع المسافة التي قطعتها القطعة القياسية 4.4 كيلو قاعدة .

تحديد حجم القطعة 3 المجهولة :



ملاحظـــة : من خلال الخطوط البيانية يمكن معرفة قيمة حجم القطعة 3 المجهولة .

يمكن تحضير هلام الاجاروز بنسب عديدة مثل 0.4% و 0.6% وغيرها . كما يمكن تحضير هلام الاجاروز اللازم لإستخلاص قطع DNA معينة . يسمى هذا النوع من الاجاروز بالاجاروز الخفيف أو سريع الذوبان

. Low - metting point agarose

تحضير هلام البولي أكرليمايد (12%) :

1- جهز صفيحة الهلام الزجاجية Glass gel former عن طريق لصق نهاية الصفيحة بشريط لاصق .

2 - حضر ما يلي في دورق زجاجي حجم 100 سم3 :

40 سم3 محلول الاكرليمايد 30% .

10 سم3 محلول TBE x 10 .

47.9 سم3 ماء مقطر .

أزل الهواء من الخليط deaeration لمدة 2 دقيقة ثم أضف :

2.1 سم3 أمونيوم بيرسلفيت 3% ammonium persulphate

30 مايكروليتر N,N,N,N - tetramethy lethylene - TEMED

3 - أمزج محلول الهلام وأفرغ محتوياته في صفيحة الهلام من خلال الفتحة العلوية .

4 - ضع المشط في موقعه المناسب في الجزء العلوي من صفيحة الهلام .

5 - أترك الهلام ليتصلب لمدة 2 ساعة .

ملاحظة :
تجنب حركة صفيحة الهلام حتى تصلبه تماماً .

6 - أزل الشريط اللاصق من نهاية صفيحة الهلام وكذلك المشط بهدوء .

7 - الهلام جاهز للإستخدام الان .

جدول : أحجام قطع الـ DNA التي يمكن فصلها بإستخدام هلام الأجاروز أو الكرليمايد .

الاكرليمايد ٪	حجم القطع bp	حجم القطع kb	الأجاروز ٪
15	150 - 25	30 - 2	0.8 - 0.5
12	200 - 40	20 - 0.7	0.75
5	400 - 60	10 - 0.5	1
3.5	500 - 100	3 - 0.2	1.5
	2000 - 500	2 - 0.1	2

الهجرة الكهربائية من خلال هلام الاكرليمايد :

1 – ضع كمية مناسبة من محلول 1x TEA في حاوية الهجرة الكهربائية .

2 – ضع صفيحة الهلام (مع الهلام) في موقعها داخل حاوية الهجرة .

3 – أخلط نموذج الـ DNA المطلوب تحليله مع 2 مايكروليتر من محلول التحميل .

4 – اخلط نموذج قطع DNA قياسي (PBR 322 Hae III fragments) مع 2 مايكروليتر من محلول التحميل .

5 – ضع نماذج الـ DNA كل على انفراد في حفر الهلام .

6 – أغلق جهاز الهجرة الكهربائية وتجنب رج الجهاز .

7 – أفتح التيار الكهربائي وأضبط التيار بحيث يكون بقوة 25 ملي أمـبير . أترك الهجرة لمدة 4 - 6 ساعات .

8 – أغلق التيار الكهربائي وأزل الأقطاب الكهربائية وغطاء جهاز الهجرة .

9 – أرفع صفيحة الهلام بهدوء للحفاظ على الهلام دون تلف .

10 – أصبغ الهلام حسب الطريقة التالية ثم حلل النتائج .

صباغة هلام الكرليمايد :

1 – غطس الهلام في محلول CTAB 1% لمدة 30 دقيقة .

ملاحظـــة :

أحمـل الهـلام على صفـيحة الـزجاجـية وأنتبـه جيـداً لعـدم انزلاق الهلام وتحطمه .

2 – غطس الهلام في الماء المقطر لمدة 30 دقيقة .

3 – غطس الهلام في سائل الامونيا 1% لمدة 15 دقيقة .

4 – غطس الهلام في محلول نترات الفضة لمدة 30 دقيقة .

5 – غطس الهلام في الماء المقطر لمدة 15 ثانية .

6 – غطس الهلام في محلول التظهير Developer لمدة 30 دقيقة .

7 – أغسل الهلام بمحلول جليسيرول 2% لمدة 10 دقائق .

8 – أغسل الهلام بالماء المقطر لمدة 5 دقيقة .

9 – أحفظ الهلام في حقيبة بلاستيكية مع إضافة 5 سم3 من الماء المقطر وأغلق الحقيبة حرارياً .

10 – أفحص الهلام بالضـــوء الاعتيادي حيث تظهر حزم الـ DNA ســـوداء اللون أو بنية .

الفصـل الخـــامس

نقل نماذج الـ DNA الى الأغشيـة

DNA transfer to filters

مقــــدمة

ان وجود قطع الحامض النووي DNA في الهلام بعد الهجرة الكهربائية يعيق الكثير من عمليات الهندسة الوراثية التي تستهدف قطع الـ DNA هذه . لذلك فإن نقل هذه القطع الى أغشية ورقية أو نايلون خاصة بنفس ترتيبها على الهلام ساهم كثيراً في حل واحدة من المعضلات الرئيسية التي كانت تواجه عمليات تحليل المورثات وغيرها .

يتم نقل الـ DNA من الهلام الى الأغشية عن طريق الصفة التنافذية للهلام . فإذا ما وفرنا قاعدة ورقية تحت الهلام ووضعنا غشاء خاص فوق الهلام وطبقة من الأوراق فوقها . فإن جريئات محلول الهجرة سوف تنفذ من خلال القاعدة الورقية فالهلام نحو الغشاء ثم مخترقة الغشاء نحو طبقة الأوراق العلوية . وأثناء سير أو تنافذ جزيئات المحلول فإنها تقوم بنقل جزيئات الـ DNA من الهلام وتلصقها بالسطح المواجه للهلام من الغشاء . أن معظم الاغشية المستخدمة في النقل مؤلفة من مواد تعمل على الاحتفاظ بجزيئات الـ DNA عليها دون الجزيئات الاخرى . ومن أشهر هذه الاغشية : أغشية النتروسليلوز والاغشية النايلون -Hy bond .

يعامل الهلام عادة بمحاليل معينة قبل نقل الـ DNA لأجل تسهيل هجرة جزيئات الـ DNA نحو الأغشية .

لذلك يعامل الهلام أولاً بمحلول يعمل على فك الأشرطة المزدوجة وجعلها مفردة وآخر يعمل علي تحطيم هذه الاشرطة الى قطع صغيرة جداً دون المساس بترتيبها ضمن القطعة الواحدة أو الحزمة الواحدة .

طريقة نقل الـ DNA من الهلام الى الاغشية :

1 – أجري هجرة كهربائية لنماذج الـ DNA المراد نقلها بعد معاملتها بالانزيم القاطع .

2 – غطس الهلام بمحلول حامض هيدروكلوريك HCl تركيز 0.25 مولاري لمدة 10 دقائق .

3 – غطس الهلام بمحلول قاعدي Denaturing Solution لمدة ساعة واحدة .

4 – غطس الهلام في محلول متعادل Neutralizing Solution لمدة 45 دقيقة .

5 – استخدم حاوية الهجرة الكهربائية في النقل . أضف كمية من محلول 10 x SSC بحيث يكون مستواه في الحوضين الجانبين في مستوى أو أقل من مستوى موضع صفيحة الهلام في الحاوية .

6 – أقطع ورقة ترشيح بنفس عرض الهلام وطول 30 سم .

7 – بلل ورقة الترشيح التي أعددتها بمحلول SSC ثم ثبتها على موضع صفيحة الهلام في حاوية الهجرة بحيث تتدلى نهايتيها في حوضي محلول الهجرة .

ملاحظة :

بواسطة أصابع اليد (يجب ارتداء كفوف مطاطية) أزل الفقاعات الهوائية التي من الممكن أن توجد بين ورقة الترشيح وسطح موضع صفيحة الهلام .

8 – ضع الهلام في موضعه فوق ورقة الترشيح وتخلص من الفقاعات الهوائية التي يمكن أن توجد بين الهلام وورقة الترشيح .

9 – أقطع غشاء نقل مناسب – نتروسليلوز أو غشاء نايلون بحجم الهلام وثبت علامه بالقلم الرصاص في أحد أركان الغشاء لمعرفة السطح المقابل للهلام .

10 – ضع غشاء النقل فوق الهلام تماماً وتخلص من الفقاعات الهوائية كما سبق .

11 - ضع حزمة كبيرة من ورق الترشبح بحجم الهلام فوق غشاء النقل .

12 - ضع صفيحة زجاجية ثقيلة (يمكن وضع صفيحتان أو ثلاثة) فوق حزمة ورق الترشيح .

> ملاحظـــة :
> يمكـن وضـع 5 أوراق ترشيح فوق غشـاء النقل وحزمة كبيرة من الورق الصــحي Klenex فوقها بدلاً من حزمة أوراق الترشيح في الخطوة 11 .

13 - بعد نهاية النقل جفف غشاء النقل عن طريق وضعه في جهاز مشفط حـراري Backed/Vacum system بدرجة حرارة 80مْ لمدة ساعتين بحيث يكون سطح غشاء النقل نحو الاعلى لتثبيت الـ DNA على الغشاء . بعد ذلك يكون الغشاء جاهزاً لاية معاملات اخرى .

تثبيت الـ DNA على أشرطة غشائية Dot Blot :

1 - ضع أنابيب الـ DNA (في حالة وجود تراكيز مختلفة من الـ DNA) في حمام مائي بدرجة حرارة 95مْ (حالة الغليان) لمدة 10 دقائق .

2 - أترك الأنابيب تبرد بدرجة حرارة الغرفة لمدة نصف ساعة .

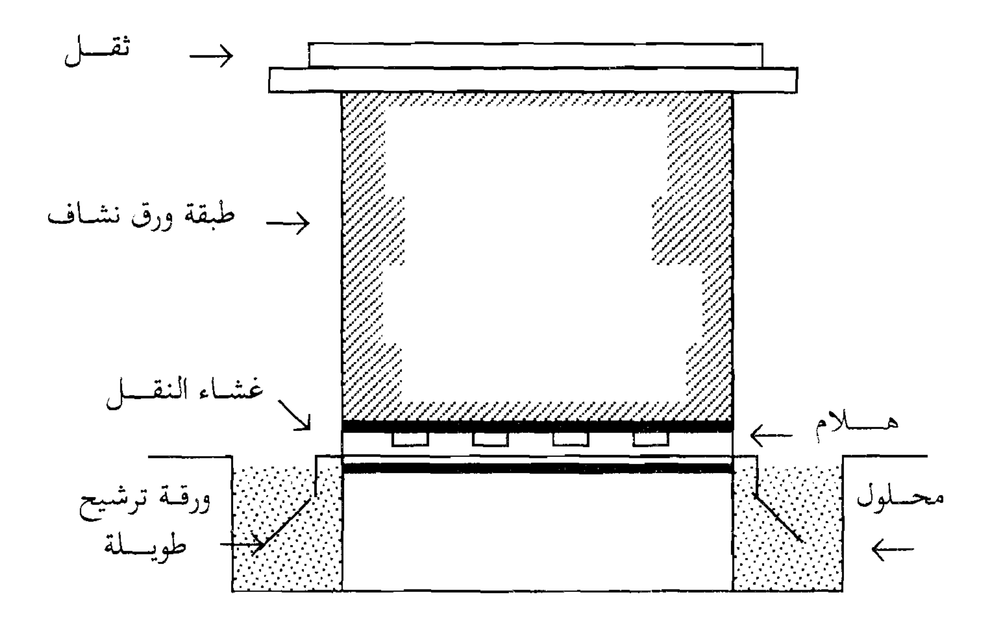
3 - أقطع غشاء نقل على هيئة شريط بطول وعرض مناسب للعمل .

4 - بماصة أنقل نماذج الـ DNA على الشريط الغشائي .

5 - جفف الشريط بوضعه في حاضنة بدرجة حرارة 25مْ لمدة نصف ساعة .

6 - غطس الشريط في المحلول القاعدي Denaturing Solution لمدة دقيقة واحدة ثم دقيقة أخرى في المحلول المتعادل .

7 - جفف الشريط بدرجة حرارة 80مْ في جهاز شفط حراري بنفس الطريقة السابقة .



شكل : نقل الـ DNA من الهلام الى الاغشية

الفصل السادس

تحضير المجسات الموسمة

Probes Labeling Preparation

محاليل

- محلول داريء لتفاعل ترجمة الثلم **Nick translation Buffer** :

التركيز	الوحدة	المادة	
0.5	M	Tris - cl	
0.1	M	$Mgcl_2$	PH = 7.4
1	m M	DTT	
0.5	ملغرام/سم^3	BSA	

- محلول داريء لتفاعل الانزيم **Klenow fragments** :

التركيز	الوحدة	المادة	
0.67	M	HEPES	
0.17	M	Tris - cl	PH = 8.6
17	mM	$Mgcl_2$	
1.33	ملغرام/سم^3	BSA	
وحدة/سم^3		Random Hexamer Primers 18 OD_{260}	

- محلول داريء لتفاعل الانزيم **Taq Polymerase** :

التركيز	الوحدة	المادة	
100	mM	Tris - cl	
500	mM	KCl	PH = 8.3
15	mM	$Mgcl_2$	

- محلول داريء لتفاعل الانزيم **T4 ~Polymerase/Kinase** :

التركيز	الوحدة	المادة	
500	mM	Tris - cl	
100	mM	$Mgcl_2$	PH = 8.0
50	mM	DTT	

- محلول داريء لتفاعل الفوسفاتيز القاعدي Alkaline Phosphatase :

500	mM	Nacl	
100	mM	Tris - cl	
100	mM	$Mgcl_2$	PH = 7.9
10	mM	DTT	

- محلول داريء الانزيم TdT :

0.5	M	Potassium cacodylate	
5	mM	$Cocl_2$	
5	mM	DTT	PH = 7.2

- محلول D Nase I (1 ملغرام/سم^3) :

10	ملغرام	D NAse I
10	سم^3	ماء مقطر
0.15	M	Nacl

مقـــدمة

تستهدف طرق تحضير المجسات الموسمة بناء مجسات تحتوي في تركيبها على عناصر ذات نشاط اشعاعي أو فلورسني بحيث يمكن تحديد موقعها بسهولة . ان معظم التفاعلات الكيمائية التي تؤدي الى توسيم المجسات تستند الى حقيقة علمية وهي تصنيع أو بناء مجسات موسمة عن طريق نشاط البلمرة في الانزيمات من نسخة مجس غير موسمة تمثل قالب لبناء النسخة الموسمة . ان عملية التوسيم هذه تتم عن طريق استعمال نيوكليوتيدات موسمة اشعاعياً أو مناعياً أو فلورسنياً في عملية البلمرة لبناء نسخة المجس .

هناك عدة طرق لتوسيم المجسات أهمها :

1 – تفاعل ترجمة الثلمة Nick Translation

2 – تصنيع البادئة العشوائي Random Primer Synthesis

3 – توسيم النهايات End - Labeling

4 – التوسيم بالـ PCR PCR Probing

5 – توسيم الـ DNA المتمم c DNA Probing

تعتبر هذه التفاعلات من أشهر التفاعلات المستخدمة في المختبرات لتوسيم المجسات .

ملاحظـــة :

يجب اجراء هذه التفاعلات (عند استخدام مواد مشعة قوية) في غرفة خاصة بالنظائر المشعة واتخاذ كافة الاحتياطات اللازمة في مثل هذه الأعمال مثل استخدام قفازات خاصة ونظارات خاصة وحواجز من البايركس البلاستيكي السميك وغيرها . كما يجب حفظ السوائل الزائدة والفضلات الورقية وغيرها في حافظات خاصة بالمواد المشعة .

توسيم المجسات بتفاعل ترجمة الثلم **Nick translation** :

لنفترض بأن المجس المطلوب تحضيره يمثل المورث A :

1 – حضر التفاعل التالي في أنبوبة أبندروف :

5	ما يكروليتر من محلول المورث A(200 نانوغرام/مايكروليتر) .
4	مايكروليتر من محلول d NTP(ما عدا d CTP)
2.5	مايكروليتر من محلول دارىء لتفاعل ترجمة الثلم 10 x .
1	مايكروليتر من محلول D Nase I (تخفيف 10,000) .
1	مايكروليتر من أنزيم DNA Pol I .
10	مايكروليتر ^{32}P - dCTP- .
1.5	مايكروليتر ماء مقطر .

2 – أمزج محتويات التفاعل جيداً لعدة ثواني .

3 – أحضن التفاعل بدرجة حرارة 14°م لمدة 45 دقيقة .

4 – ضع أنبوبة التفاعل في حمام ثلجي وأضف التالي الى محلول التفاعل :

1	مايكروليتر	0.5 M EDTA
20	مايكروليتر	3M Sodium acetate
3	مايكروليتر	Yeast t RNA
150	مايكروليتر	ماء مقطر
100	مايكروليتر	فينول
100	مايكروليتر	كلوروفورم

5 – أمزج جيداً بالطرد المركزي بقوة 2000 دورة في الدقيقة لمدة دقيقة واحدة .

6 – أنقل الطبقة المائية العلوية الى أنبوبة أبندروف نظيفة .

7 – أضف 500 مايكروليتر من كحول الايثانول المطلق المثلج الى محلول

التفاعل . احفظ أنبوبة التفاعل بدرجة حرارة - 20 مْ لمدة نصف ساعة .

8 - اطرد الانبوبة مركزياً لترسيب الـ DNA (المجس الموسم) .

9 - تخلص من الراشح وجفف الراسب ثم أذبه بإضافة 1 سم3 من الماء المقطر .

ملاحظــة :
أجمع الراشح من الخطوة 8 في وعاء خاص لأن الراشح يحتوي على مواد مشعة عالية الخطورة .

10 - أحسب النشاط الاشعاعي للمجس بإستعمال الطريقة الخاصة بذلك بإستخدام جهاز عداد الاشعاعات Scintillation Counter .

11 - المجس الموسم اشعاعياً جاهز الان للإستخدام في تهجين الحامض النووي .

تحضير المجس بتفاعل تصنيع البادئة العشوائي Random Primer synthesis :

1 - حضر التفاعل التالي في أنبوبة أبندروف نظيفة :

3 مايكروليتر محلول DNA(20 - 50 ناتوغرام) .

3 مايكروليتر محلول dNTP(ماعدا dCTP) .

2 مايكروليتر خليط التفاعل 10 x Hexanucleotide mixture .

5 مايكروليتر محلول P^{32} d CTP .

6 مايكروليتر ماء مقطر

1 مايكروليتر أنزيم Klenow fragment (وحدتان) .

2 - إحضن التفاعل بدرجة حرارة الغرفة (25مْ) لمدة 18 ساعة .

3 - أضف 2 مايكروليتر من محلول 0.5M EDTA .

4 - تخلص من المواد الزائدة في التفاعل بالطريقة التالية :

طريقة تنقية تفاعل تصنيع البادئة العشوائي :

أ - اغسل عمود Nick colum - Sephadex G - 50 بإضافة 10 سم3 من محلول TE معقم والسماح له بالمرور عبر العمود حتى انتهاء آخر قطره منه .

ب - أضف محتويات التفاعل الى العمود+400 مايكروليتر من محلول TE .

جـ - أجمع المحلول المتساقط من نهاية العمود في أنبوبة أبندروف .

د - أضف 400 مايكروليتر من محلول TE الى العمود وأجمع المحلول المتساقط من نهاية العمود في أنبوبة ثانية .

هـ - كرر عملية اضافة محلول TE للعمود أربعة مرات اضافية وأجمع في كل مرة ما يتساقط من المحلول من نهاية العمود .

5 - اقرأ النشاط الاشعاعي لكل أنبوبة من الأنابيب الستة التي تم الحصول عليها من التنقية بإستخدام جهاز عداد الاشعاعات كما سبق في تفاعل ترجمة الثلم .

6 - أجمع محلول الأنابيب التي تحتوي على نشاط عالي من الاشعاعات في أنبوبة واحدة .

ملاحظة :

الأنابيب التي تسجل نسبة عالية من الاشعاع تؤكد وجود المجس الموسم اشعاعياً فيها .

7 - المجس الموسم اشعاعياً جاهز الان للإستخدام في التهجين .

تحضير المجس بتفاعل توسيم النهايات : End Labelling reaction

1 - توسيم النهاية الثالثة :

الطريقة الأولى :

1 - حضر قطع الـ DNA المراد توسيم نهايتيها الثالثة .

2 – حضر التفاعل التالي في أنبوبة أبندروف مناسبة :

7 مايكروليتر محلول قطع الـ DNA (1 مايكروجرام) .

2 مايكروليتر محلول دارىء للإنزيم 10 x T4 Polymerase

10 مايكروليتر ^{32}P d CTP .

1 مايكروليتر أنزيم البلمرة T4 Polymerase (10 وحدات) .

3 – أمزج الخليط وأحضنه بعد ذلك بدرجة حرارة 37.5م لمدة 5 دقائق .

4 – أضف المحاليل التالية الى محلول التفاعل :

1 مايكروليتر 0.5M EDTA .

76 مايكروليتر ماء مقطر .

3 مايكروليتر Yeast t RNA .

50 مايكروليتر سائل فينول .

50 مايكروليتر كلوروفورم .

5 – أمزج جيداً ثم أطرد الانبوبة مركزياً بقوة 2000 دورة في الدقيقة لمدة دقيقتان .

6 – أنقل الطبقة العلوية (طبقة الـ DNA) الى أنبوبة نظيفة .

ملاحظـــة :

يمكن في هــــذه المرحـــلة تنقيـة التـفاعـل بإســتعـمـال عـمـود الفصـــل Sephadex - G - 25 - 50 .

7 – اقرأ النشاط الاشعاعي لنموذج التفاعل .

8 – المجس جاهز الان للإستخدام .

الطريقة الثانية :

1 – حضر قطع الـ DNA المراد توسيم نهايتيها الثالثة .

2 – حضر التفاعل التالي في أنبوبة تفاعل مناسبة .

4 مايكروليتر محلول قطع الـ DNA (100 - 200 ناتوجرام) .

10 مايكروليتر P^{32} d TP

4 مايكروليتر محلول دارىء لانزيم TdT

2 مايكروليتر أنزيم Terminlal dioxynucleotidyl transferase (10 وحدات) .

3 – أمزج الخليط وأحضنه بدرجة حرارة 37.5 مْ لمدة 30 دقيقة .

4 – أضف المحاليل التالية الى محلول التفاعل :

1 مايكروليتر 0.5M EDTA

50 مايكروليتر ماء مقطر .

50 مايكروليتر فينول .

50 مايكروليتر كلورفورم .

5 – أمزج جيداً وأطرد الأنبوبة مركزياً بقوة 2000 دورة في الدقيقة لمدة دقيقتان .

6 – أنقل الطبقة العلوية (طبقة الـ DNA) الى أنبوبة نظيفة .

> **ملاحظـــة :**
>
> يمكن تنقيـــة التفـــاعل في هذه المرحلـــة بإستخدام عمـــود الفصل Sephaclex G - 50 .

7 – اقرأ النشاط الاشعاعي للمجس .

8 – المجس جاهز للإستخدام .

2 - توسيم النهاية الخامسة :

1 - حضر التفاعل التالي في أنبوبة تفاعل مناسبة :

10	مايكروليتر	محلول قطع الـ DNA 100 - 200 نانوجرام .
5	مايكروليتر	محلول دارىء لأنزيم الفوسفاتيز القاعدي .
2	مايكروليتر	أنزيم الفوسفاتيز القاعدي Alkaline Phosphates (10 وحدات) .
33	مايكروليتر	ماء مقطر معقم .

2 - أحضن التفاعل بدرجة حرارة 37.5 مْ لمدة ساعة .

3 - أضف 2 مايكروليتر من محلول 0.5M EDTA .

4 - أحضن التفاعل بدرجة حرارة 70مْ لمدة 10 دقائق .

5 - أضف المحاليل التالية الى أنبوبة التفاعل :

20	مايكروليتر	3M Sodium acetate .
50	مايكروليتر	ماء مقطر معقم .
50	مايكروليتر	فينـــول .
50	مايكروليتر	كلوروفـــورم .

6 - أمزج المحلول وأطرد أنبوبة التفاعل مركزياً بقوة 2000 دوره في الدقيقة لمدة دقيقتان .

7 - أنقل الطبقة العلوية (طبقة الـ DNA) الى أنبوبة نظيفة .

8 - أضـــف 500 مايكروليتر من الكحول الأثيلي المطلق المثلج الى أنبوبة محلول الـ DNA .

9 - أحفظ الانبوبة بدرجة حرارة - 20 مْ لمدة نصف ساعة .

10 - أطرد الانبوبة مركزياً لترسيب الـ DNA بقوة 2500 دوره في الدقيقة لمدة 10 دقائق .

11 – تخلص من الراشح وجفف الراسب ثم أذبه بإضافة 100 مايكروليتر من الماء المقطر المعقم (محلول قطع الـ DNA) .

12 – حضر التفاعل التالي في أنبوبة تفاعل مناسبة :

10 مايكروليتر محلول قطع الـ DNA (100 - 200 ناتوجرام) (خطوة 11) .

1 مايكروليتر محلول دارىء لانزيم T4 Kinase .

5 مايكروليتر r - ^{32}P ATP

1 مايكروليتر أنزيم T4 Polynucleotide Kinase (10 وحدات) .

13 – أمزج المحلول جيداً وأحضن التفاعل بدرجة حرارة 37.5مْ لمدة 30 دقيقة .

14 – أضف الى محلول التفاعل 2 مايكروليتر 0.5M EDTA وأحضن التفاعل بدرجة حرارة 70مْ لمدة 10 دقائق .

15 – أضف المحاليل التالية الى محلول التفاعل :

83 مايكروليتر ماء مقطر معقم .

50 مايكروليتر فينول .

50 مايكروليتر كلوروفورم .

16 – أمزج جيداً وأطرد الانبوبة مركزياً بقوة 2000 دوره في الدقيقة لمدة دقيقتان .

17 – أنقل الطبقة العلوية (طبقة الـ DNA) الى أنبوبة نظيفة .

ملاحظة :

يمكن تنقية محلول الـ DNA بإستخدام عمود الفصل Sephadex - G - 50 .

18 – اقرأ النشاط الاشعاعي لمحلول الـ DNA (محلول المجس) .

19 – المجس جاهز للإستخدام الان .

تحضير المجسات بإستخدام تفاعل PCR :

يحتاج هذا التفاعل استخدام بادئات مناسبة للمجس المطلوب توسيمه . ونظراً لاختلاف المجسات فإن البادئات المستخدمة في التفاعل يجب أن تناسب المجس .

1 - حضر التفاعل التالي في أنبوبة مناسبة :

10 مايكروليتر محلول قطع الـ DNA (المجس) .

2 مايكروليتر محلول بادئات (150 نانوجرام لكل بادئة) .

10 مايكروليتر محلول دارىء للانزيم 10 x Taq .

6 مايكروليتر محلول d NTP (ما عدا d CTP) .

2 مايكروليتر محلول 32p dc TP .

2 مايكروليتر أنزيم Taq Polymerase (10 وحدات) .

95 مايكروليتر ماء مقطر معقم .

2 - أمزج خليط التفاعل جيداً وأضف 50 مايكروليتر زيت معدني لتغطية التفاعل لمنع تبخر السوائل أثناء الحضانة .

3 - أضبط جهاز الدورة الحرارية عند درجة حرارة 94 - 95 مْ لمدة 40 ثانية و 50مْ لمدة دقيقة و70 - 72 مْ لمدة دقيقتان وثبت كذلك عدد الدورات المطلوبة للتضخيم .

4 - ضع أنبوبة التفاعل في جهاز الدورة الحرارية حتى نهاية التفاعل .

5 - أحضن التفاعل بدرجة حرارة 72مْ لمدة 5 دقائق .

6 - أضف الى محلول التفاعل 2 مايكروليتر من محلول 0.5M EDTA وأحضن بدرجة حرارة 70مْ لمدة 10 دقائق .

7 – أضف الى محلول التفاعل المحاليل التالية :

100 مايكروليتر فينـــول .

100 مايكروليتر كلوروفورم .

8 – أمزج جيداً ثم أطرد الانبوبة مركزياً بقوة 2500 دوره في الدقيقة لمدة دقيقتان .

9 – أنقل الطبقة العلوية (طبقة المجس) الى أنبوبة نظيفة .

ملاحظـــة :

يمكن في هذه المرحلـــة تنقية محلول المجس بإســـتخدام عمود الفصل Sephadex G - 50 .

10 – اقرأ النشاط الاشعاعي لمحلول المجس .

11 – المجس جاهز للإستخدام الان .

تحضير المجسات بإنتاج شريط c DNA :

يمكن الرجوع لهذه الطريقة في الفصول القادمة وتستخدم أحد النيوكلوتيدات الموسمة اشعاعياً بدلاً من النيوكليوتيدات الطبيعية (مثلاً استخدام ^{32}P dc TP بدلاً من dcTp) . وكذلك استخدام جزيئة m RNA كقالب لتصنيع المجس cDNA الموسم اشعاعياً .

الفصـل السـابع

تهجين الحامض النووي DNA

DNA Hybridization

مقدمة

تستند تقنية تهجين الحامض النووي DNA الى حقيقة أن الترددات المتكاملة منه لها القدرة على إعادة الارتباط مرة أخرى بعد فصلها .

لذلك فإن تهجين الحامض النووي يتم بإستخدام تحضيرات من الـ DNA مفردة الشريط وكذلك استخدام مجسات موسمة مفردة الشريط متكاملة مع تردد معين تظهر لها على الـ DNA المراد تحليله .

لذلك فإن ارتباط المجس الموسم اشعاعياً تحت ظروف فيزيائية معينة مع التردد النظير له على الـ DNA المفحوص سوف يؤدي الى توفير الفرصة لمعرفة موقع التردد النظير من خلال تتبع أثر الاشعاعات التي يطلقها المجس الموسم .

ان هذه التقنية وفرت الكثير من المعلومات من خلال قدرتنا على تحديد مورث معين على قطعة معينة من الـ DNA أو حتى تحديد موقعه على الكروموسومات .

محاليل

1 – محلول 20 x SSC :

175.3 غرام	Nacl
88.2 غرام	Sodium Citrate
+ لتر ماء مقطر – PH = 7.0	

يمكن تحضير محاليل 10 x SSc و 5 x و 2 x من تخفيف المحلول 20 x SSC بالماء المقطر .

2 – محلول قبل التهجين Pre - hybridization solution (10 سم^3) :

6 سم^3	10 x SSC
0.5 سم^3	%2 SDS
1 سم^3	محلول دينهارت Denhart's Solution
2.5 سم^3	مـاء مقطـر
25 مايكروجرام	Denaturated salmon sperm DNA

3 – محلول التهجين Hybridization solution (10 سم^3) :

6 سم^3	10 x SSC
0.5 سم^3	%2 SDS
1 سم^3	محلول دينهارت
2 سم^3	Dextran sulphate
0.5 سم^3	مـاء مقطـر
25 مايكروجرام	Denaturated Salmon Sperm DNA

50 - 100 مايكروجرام DNA مجس موسم اشعاعياً .

4 – محلول الغسيل رقم 1 :

%0.1 SDS + 5 x SSc

5 – محلول الغسيل رقم 2 :

%0.1 SDS + 2 x SSC

6 – محلول الغسيل رقم 3 :

%0.1 SDS + 0.1 x SSC

- الوسط الغذائي ماكوي 5 A
- الوسط الغذائي DMEM
- محلول هانكس .Hank's Sol

(أنظر زراعة الخلايا في الفصل الأول)

7 – محلول ملحي مخفف Hypotonic Solution :

1 – 1 حجم DMEM + 2 حجم ماء مقطر

أو

2 – 0.68 M KCL

8 – محلول التظهير Developer (لتظهير الهلام الفوتوغرافي) :

1 حجم Kodak Dectol developer

1 حجم ماء مقطر

9 – محلول المثبت Fixer (لتثبيت الهلام الفوتوغرافي) :

1 حجم Kodak Ilford Hypam

\+

1 حجم Kodak Ilford rapid Hypam

2 حجم ماء مقطر

10 - محلول الفورماميد Formamide Solution :

100 سم3 فورماميد

10 غرام Amberlite beads

أمزج لمدة ساعة واحدة - رشح خلال ورقة ترشيح What man No. 1 وأحفظ محلول الفورماميد بقناني 10 سم3 بدرجة حرارة - 20مْ .

11 - محلول دينهارت :

1 جزء Ficoll 400

1 جزء PVP

1 جزء BSA

يتم تحضير كل محلول من المحاليل الثلاثة أعلاه بمفردة وحفظها في كميات متساوية بدرجة حرارة - 20 مْ حتى الاستخدام .

10 - محلول الفورماميد **Formamide Solution** :

100 سم3 فورماميد

10 غرام Amberlite beads

أمزج لمدة ساعة واحدة - رشح خلال ورقة ترشيح What man No. 1 وأحفظ محلول الفورماميد بقناني 10 سم3 بدرجة حرارة - 20مْ .

11 - محلول دينهارت :

1 جزء Ficoll 400

1 جزء PVP

1 جزء BSA

يتم تحضير كل محلول من المحاليل الثلاثة أعلاه بمفردة وحفظها في كميات متساوية بدرجة حرارة - 20 مْ حتى الاستخدام .

تهجين الأغشية بمجس موسم اشعاعياً :

1 – حضر تفاعل 10 مايكروجرام من الـ DNA مع الانزيم القاطع المناسب .

2 – استخدم الهجرة الكهربائية عبر هلام الاجاروز 0.8% لفصل قطع الـ DNA حسب الطريقة الخاصة بذلك .

3 – أنقل قطع الـ DNA من الهلام الى غشاء مناسب حسب الطريقة الخاصة بذلك .

4 – بلل الغشاء بوضعه على سطح محلول 5 x SSC .

5 – ضع الغشاء بين طبقتين من مشبك بلاستيكي .

6 – ضع الغشاء الموجود بين طبقتي المشبك البلاستيكي في كيس تهجين بلاستيكي (PVC) Heat-sealed plastic bag .

7 – أغلق النهاية السفلى للكيس البلاستيكي حرارياً وبصورة تامة .

8 – أضف 10 سم$_3$ محلول قبل التهجين Pre-hybridization Solution الى كيس أو حقيبة التهجين عبر الفتحة العلوية الخاصة بذلك .

9 – أغلق حقيبة التهجين عبر غلق فتحة ادخال السوائل العلوية بغطاءها الخاص .

10 – غطس حقيبة التهجين في حمام مائي بدرجة حرارة 65مْ لمدة 1 - 12 ساعة .

> **ملاحظة :**
>
> وزع محلول قبل التهجين على الغشاء من خلال تحريك حقيبة التهجين يميناً ويساراً من فترة الى اخرى .

11 – حضر خلال فترة الانتظار 10 سم$_3$ من محلول التهجين Hybridization Solution وأضف اليه محلول المجس الموسم اشعاعياً .

ملاحظـات :

- حضر المجس الموسم اشعاعياً تبعاً للطرق التي سبق الحديث عنها . ضع أنبوبة المجس في حمام مائي بدرجة حرارة الغليان لمدة 10 دقائق ثم برد المحلول بدرجة حرارة الغرفة .
- تستهدف هذه العملية فصل الاشرطة المزدوجة للمجس للحصول على أشرطة مفردة تتمكن من الارتباط مع الموقع النظير لها من قطع الـ DNA على الغشاء أثناء عملية التهجين .
- أضف محلول المجس الموسم اشعاعياً بعد ذلك الى محلول التهجين .

12 - أفتح غطاء السوائل في حقيبة التهجين وأضف محلول التهجين الذي يحتوي على المجس الموسم اشعاعياً الى الحقيبة . أغلق فتحة السوائل مرة أخرى .

13 - أحضن الحقيبة في حمام مائي بدرجة حرارة 65مْ لمدة 12 - 18 ساعة مع تحريك السوائل بداخلها من فترة الى اخرى لتوزيع المحلول بشكل متجانس على الغشاء .

14 - تخلص من السوائل الموجودة في حقيبة التهجين عن طريق فتحة السوائل في الحقيبة .

15 - قص نهاية حقيبة التهجين السفلية بالمقص وأنزع طبقات المشبك البلاستيكي وأنقل الغشاء المهجن الى محلول غسيل رقم 1 .

16 - حرك وعاء محلول الغسيل رقم 1 لإزالة المواد المشعة **الزائدة من الغشاء** المهجن ولمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة .

17 - أنقل الغشاء المهجن الى محلول الغسيل رقم 2 وحرك وعاء الغسيل بعد ذلك لإزالة المزيد من المواد المشعة الزائدة لمدة 20 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة .

18 – اغسل الغشاء مرة أخيرة بمحلول الغسيل رقم 3 بدرجة حرارة 65مْ لمدة 2 - 5 دقيقة .

19 – أنقل الغشاء المهجن الى ورقة ترشيح جافة لمدة دقيقتان .

20 – غلف الغشاء بطبقتي نايلون خفيفي جداً Cling Film .

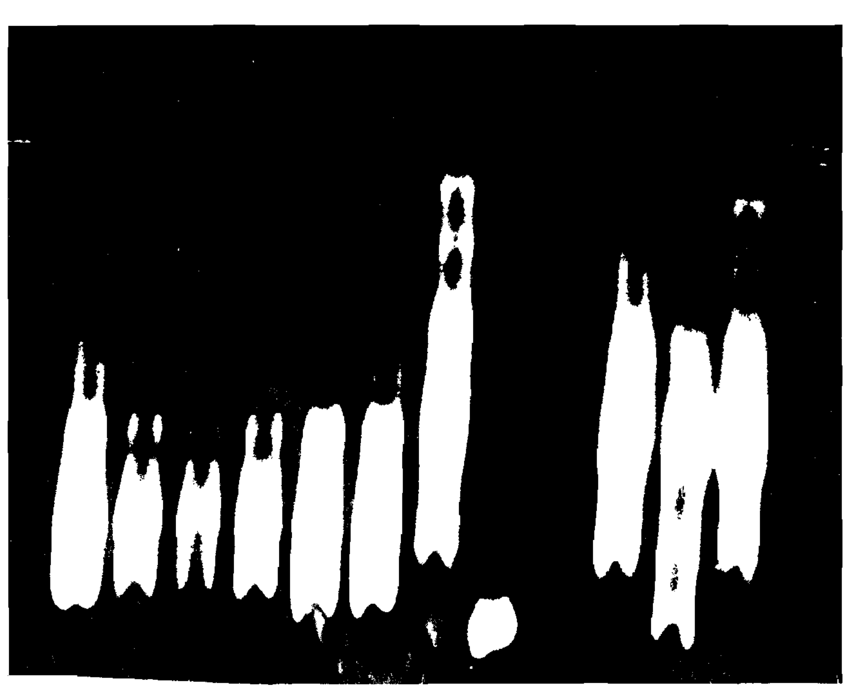
21 – في غرفة مظلمة غطي الغشاء بفلم أشعة اكس وأغلق الكاسيت الخاص بذلك جيداً .

22 – أحفظ الكاسيت بدرجة حرارة – 20 مْ لمدة 7 - 14 يوماً .

23 – في غرفة مظلمة أنقل فلم أشعة اكس الى محلول التحميض والتظهير ثم أغسله بالماء الجاري لدقيقتين .

24 – جفف فلم أشعة اكس بالتعليق .

25 – حلل النتائج .



شكل : صورة فوتوغرافية مأخ[illegible]وح فلم – اشعة اكس بعد تعريضه لغشاء موسم اشعاعياً ثم تحميضه .

تهجين التحضيرات الخلوية In Situ hybridization :

الطريقـــة الأولى : تهجين تحضيرات الخلايا الدموية (المأخوذة من مزارع الدم والنخاع) :

آ – تحضير مجاميع الكروموسومات :

1 – اسحب 3 سم3 من الدم الوريدي وأخلطه مع مانع التخثر في قنينة دم .

2 – أنقل 0.75 سم3 من الدم الى قنينة زراعة مزودة بـ 10 سم3 من الوسط الغذائي ماكوي McCy's 5A media .

3 – أحضن قنينة الزراعة لمدة 72 ساعة بدرجة حرارة 37.5 مْ في حاضنة 5% ثاني أوكسيد الكاربون .

ملاحظة :
لا تغلق قنينة الزراعة بقوة للسماح لثاني أوكسيد الكاربون بالنفوذ .

4 – أضف 100 مايكروليتر من الى محلول الكولسميد Colcemid (تركيز 10 ملغرام/سم3) الى محلول الخلايا .

5 – أمزج بهدوء وأحضن قنينة الزراعة لمدة 20 دقيقة اخرى بدرجة حرارة 37.5مْ في حاضنة 5% ثاني أوكسيد الكاربون .

6 – أنقل محتويات قنينة الزراعة الى أنبوبة طرد مركزي معقمة .

7 – أطرد الانبوبة مركزياً بقوة 1000 دوره في الدقيقة لمدة 10 دقائق .

8 – أسحب معظم محلول الرائق من أنبوبة الطرد وتخلص منه .

9 – أذب راسب الخلايا بما تبقى من محلول الراشح .

10– أضف 10 سم3 من محلول قليل الملح Hypotonic Solution (0.68 M Kcl) الى محلول الخلايا .

11 – أمزج محتويات الانبوبة جيداً واتركها بدرجة حرارة 37.5 مْ لمدة 30 دقيقة .

12 – حضر المحلول المثبت خلال فترة الانتظار وكتالي :

3 أجزاء ميثانول + جزء واحد حامض الخليك الثلجي .

13 – أضف الى محـلول الخلايـا 0.2 سم3 من محلول التثبيـت وأمـزج جيداً . Pre - fixation

14 – أطرد أنبوبة محلول الخلايا مركزياً بقوة 1000 دوره في الدقيقة لمدة 10 دقائق .

15 – أسحب معظم الراشح (أترك 1 سم3 فقط من الراشح) وأضف 10 سم3 من المحلول المثبت الى محلول الخلايا بهدوء عن طريق اضافته على حافة الأنبوبة وأنزاله على سطح الانبوبة .

16 – أمزج جيداً وأترك الانبوبة لمدة 10 دقائق في الغرفة .

17 – أطرد الأنبوبة مركزياً بقوة 1000 دوره في الدقيقة لمدة 10 دقائق .

18 –أسحب معظم الراشح بإستثناء 1 سم3 منه .

19 – أضف 5 سم3 من محلول المثبت الى محلول الخلايا بنفس الطريقة السابقة وأمزج جيداً .

20 – أترك لمدة 10 دقائق في الغرفة .

21 – أعد الخطوات 18 , 19 و 20 لمرة ثالثة .

22 – بعد الخطوة الاخيرة من المعاملة بمحلول التثبيت الثالثة أطرد الأنبوبة مركزياً بقوة 1000 دوره في الدقيقة لمدة 10 دقائق .

23 – تخلص من الراشح تماماً وأضف حجم مناسب من محلول التثبيت الى راسب الخلايا وأمزجه جيداً وبهدوء .

ملاحظـــة :

يجب وضع حجم مناسب من محلول التثبيت بحيث يعطي كثافة مناسبة من الخلايا . يمكن معرفة ذلك عن طريق أخذ 1 سـم^3 مـن محلول الخلايا وتقطيره من ارتفاع 20 - 30 سم على سطح شـريحة زجاجية . جفف الشريحة بالهواء وأفحص كثافة الخلايا .

24 – حضر شرائح زجاجية نظيفة ومعقمة .

25 – خذ شريحة زجاجية واحدة وعرض سطحها الى بخار الماء (من مسافة 3 سم من البخار) .

26 – بواسطة ماصة باستور معقمة خذ 3 سم^3 من محلول الخلايا ومن ارتفاع 20 - 15 سم أنزل محلول الخلايا (على هيئة قطرات غير متتالية) على سطح الشريحة الزجاجية وهي مائلة قليلاً (استخدم السطح المضبب بقطرات البخار) .

ملاحظـــة :

3 - 4 قطرات كافية للحصول على أعداد لا بأس بها من تجمعات الكروموسومات .

27 – ضع الشريحة الزجاجية على حامل مستند الى حمام مائي بدرجة حرارة 60مْ للتجفيف لمدة 5 دقائق .

28 – أترك الشريحة الزجاجية الجاهزة وهي مائلة بدرجة حرارة الغرفة .

29 – أعد الخطوات 25, 26, 27, 28 لتحضير اعداد اخرى من الشرائح الزجاجية الجاهزة .

ملاحظـــة :

المسـافة بين سطح الشـريحـة المائلة ومـاصـة باسـتـور المحـملة بمحلول الخـلايا مـهـم جداً في انفجـار نوى الخـلايا الدموية البـيضـاء لـتحـرر كروموسوماتها . ذلك أن ارتطام النوى بسطح الشـريحة الزجاجية هو الذي يؤدي الى انفجارها وإطلاق الكروموسومات .

عـلاوة على أهمـيتـه في الإبقـاء على الجـاميع الكروموسـوميـة في موقعها دون تداخل .

ب – معاملة شرائح التجمعات الكروموسومية بالفورماميد :

يجب آن لا تزيد عمر الشـرائح الزجاجية الخاصة بالتجمعات الكروموسومية التي تستخدم في التهجين عن أربعة أيام .

1 – أغمر شـرائح التجمعات الكروموسومية التي تم تحضيرها سابقاً (الخطوة أ) في وعاء كوبلن Coplin يحتوي على محلول 2x SSC + 100 مايكروجرام/سم3 من أنزيم RNase A بدرجة حرارة 37.5مْ .

2 – أحضن وعاء الشرائح بدرجة حرارة 37.5مْ لمدة ساعة .

3 – أغسل الشرائح بمحلول 2x SSC بدرجة حرارة الغرفة لمدة 10 دقائق .

ملاحظـــة :

حضر خمسة أوعية كوبلن مملوءة بمحلول 2x SSC وأترك الشرائح لمدة دقيقتين في كل وعاء .

4 – أغسل الشرائح عن طريق الغمر بمحاليل الكحولات الاثيلية 70% ، 80% ، 95% لمدة دقيقتين في كل منها .

5 – جفف الشرائح بالهواء لمدة 10 دقائق .

6 – أغمر الشرائح في وعاء كوبلن يحتوي على محلول مؤلف من 70% فورماميد + 2x SSC بدرجة حرارة 70مْ لمدة دقيقتان ونصف .

7 – أنقل الشرائح مباشرة الى محلول كحول أثيلي 70% مثلج – 20مْ لمدة 20 ثانية .

8 – أنقل الشرائح الى مدرج كحولات 70% ، 80% ، 95% لمدة دقيقتين في كل محلول .

9 – جفف الشرائح بالهواء . الشرائح جاهزة للتهجين .

جـ – تهجين شرائح التحضيرات الكروموسومية بمجس موسم شعاعياً :

1 – حضر المجس المطلوب الموسم اشعاعياً بنظير الهيدروجين الثالث (التريتيوم) H^3 حسب طرق تحضير المجسات الموسمة مستخدماً النيوكليوتيدات - H^3 dcTPA بدلاً من النيوكليوتيدات الطبيعي dcTPA . أغلي محلول المجس قبل الاستعمال بوضع أنبوبة المحلول في ماء مغلي لمدة 10 دقائق وتبريده في درجة حرارة الغرفة .

2 – حضر مجموعة من أطباق بتري الزجاجية وضع في داخل كل منها ورقة ترشيح مبللة بمحلول 70% فورماميد + 2x SSC .

3 – ضع 2 شريحة في كل طبق من أطباق بتري على أن يكون سطح الشرائح المحتوي على تجمعات الكروموسومات نحو الاعلى .

4 – غطي سطح كل شريحة بواسطة 1سم3 من محلول التهجين الذي يحتوي على المجس الموسم اشعاعياً .

5 – ضع غطاء شريحة كبير فوق كل شريحة دون ضغطه .

6 – أجمع الأطباق بهدوء بدون رج محتوياتها وأنقلها الى وعاء بلاستيكي كبير . غطي الوعاء وأحضنه مع الأطباق بدرجة حرارة 37.5مْ في حمام مائي لمدة 12 - 18 ساعة .

7 – أفتح غطاء الوعاء البلاستيكي وأنقل الأطباق على طاولة العمل .

8 – تخلص من محلول التهجين وأغطية الشرائح .

9 – أغمر الشرائح المهجنة بمحلول 2x SSC لمدة دقيقتان .

10 – أنقل الشرائح الى محلول فورماميد 50% + 2x SSc بدرجة حرارة 39مْ لمدة دقيقتان .

11 – أنقل الشرائح الى محلول 0.1 SDS + 2x SSC% بدرجة حرارة 30مْ لمدة دقيقتان .

12 – أغسل الشرائح جيداً بمحلول 0.1 SDS + 2x SSC% بدرجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق .

13 – أغسل مرة أخيرة بمحلول 2x SSC لمدة دقيقتان .

14 – أنقل الشرائح الى محاليل كحول أثيلي 70% ، 80% ، 95% لمدة دقيقتان في كل محلول .

15 – جفف الشرائح بدرجة حرارة الغرفة .

16 – غطي الشرائح بطبقة فلم جلاتيني كما هو موضح في الخطوة القادمة في غرفة مظلمة .

د – تغطية الشرائح المهجنة بالهلام الفوتوغرافي :

في غرفة مظلمة ويمكن استخدام مصباح الاضاءة الاحمر نوع Ilford 904

1 – حضر محلول الهلام الفوتوغرافي في قنينة كوبلن صغيرة بتخفيف محلول الهلام الفوتوغرافي Photographic emulsion (Kodak) مع ماء مقطر مؤين Dionized Water دافىء (درجة الحرارة 40مْ) بنسبة 1 : 1 .

2 – بواسطة قضيب زجاجي أخلط محتويات الهلام + الماء جيداً في قنينة كوبلن حتى تحوله الى لون أبيض بقوام الحليب الطبيعي .

3 – خذ شريحة مهجنة واحدة وغطسها عمودياً في محلول الهلام لمرة واحدة وأرفعها .

4 – ضع الشريحة بشكل عمودي مائل على مسند حتى تجف .

5 – غطي جميع الشرائح المهجنة بمحلول الهلام كما في الخطوتين 3 و 4 .

6 – رتب الشرائح الزجاجية المهجنة بصورة متوازية دون مساس أحداها بالاخر في صندوق أسود .

7 – أغلق الصندوق الأسود بأحكام وغلفه بطبقة من غشاء الألمنيوم .

8 – أحفظ الصندوق الأسود بدرجة حرارة 4مْ لمدة 7 - 14 يوماً .

9 – عامل الشرائح المغطاة بالهلام بمحلول التصوير المظهر Developer والمثبت Fixer كما هو موضح في الطريقة الخاصة بذلك .

هـ – طريقة تظهير الهلام الفوتوغرافي :

1 – أنقل صندوق الشرائح الزجاجية المهجنة والمغطاة بالهلام الى حاضنة بدرجة حرارة 25مْ دون فتح الصندوق .

2 – أترك الصندوق الاسود لمدة 30 دقيقة في الحاضنة .

3 – أنقل الصندوق الاسود الى غرفة مظلمة – يمكن استخدام الضوء الاحمر نوع ilford 904 .

4 – أرفع الشرائح الزجاجية المهجنة والمغطاة بالهلام من الصندوق وغطسها في محلول التظهير لمدة 5 دقائق .

5 – أغسل الشرائح بتغطيسها في محلول حامض الخليك الثلجي 2.5% لمدة 20 ثانية .

6 – ثبت الهلام عن طريق تغطيس الشرائح في محلول التثبيت لمدة 5 دقائق .

ملاحظـــة :

استخدم أوعية كوبلن لحفظ المحاليل .

7 – أغسل الشرائح بالماء المقطر لمدة 20 - 30 دقيقة .

ملاحظـــة :

في هذه المرحلة يمكن استخدام الضوء الأبيض .

8 – جفف الشرائح بوضعها عمودية مائلة على مسند .

9 – أصبغ الشرائح بصبغة جمزا أو غيرها .

10 – افحص تحت قوة x100 في مجهر ضوئي ستجد بقع فضية أو سوداء فوق الموقع الذي يمثل المورث على الكروموسوم .

الطريقة الثانية :

تهجين التحضيرات الخلوية (مزارع الجلد ، العضلات ، وغيرها) :

أ – تحضير الشرائح الزجاجية اللازمة :

1 – نظف الشرائح الزجاجية (10 - 20 شريحة) بورق سجائر مبلل بالكحول وثبت علامة G على سطح كل شريحة بشفرة زجاج .

2 – غطس الشرائح في كحول أثيلي مطلق لمدة 12 - 18 ساعة .

3 – أنقل الشرائح الزجاجية الى محلول منظف + Detergent (محلول Decon 90 10%) لمدة 24 ساعة .

4 – ضع حاوية الشرائح الزجاجية بعد تفريغها من محلول التنظيف في مجرى مائي للماء المقطر الأيوني Dionized d H_2O لمدة 5 دقائق .

5 – تخلص من الماء الموجود في حاوية الشرائح وأغمر الشرائح بالكحول الاثيلي المطلق .

6 - أحفظ الشرائح في الكحول حتى بدء الزراعة عليها .

ب - زراعة الخلايا فوق سطح الشرائح الزجاجية :

1 - أرفع شريحة زجاجية واحدة من حاوية الكحول بملقط معقم ثم عقم الشريحة بتعريضها الى اللهب لعدة ثواني .

> **ملاحظة :**
>
> ضع حاوية الشرائح الزجاجية المحتوية على الكحول على مسافة معقولة من مصدر اللهب خوفاً من الحريق .

2 - ضع الشريحة الزجاجية في طبق بتري معقم وأغلق الطبق .

3 - أعد الخطوات 1 و 2 مع كل شريحة زجاجية .

4 - أضف 1 سم3 من محلول الخلايا (1×10^5 خلية) فوق سطح كل شريحة زجاجية .

5 - أحضن الاطباق بدرجة حرارة 37.5مْ في حاضنة 5% ثاني أوكسيد الكاربون لمدة 2 ساعة .

6 - أضف 15 - 20 سم3 من الوسط الغذائي (DMEM مثلاً) لكل طبق وأتركها في الحاضنة لمدة 18 - 24 ساعة أخرى .

7 - أضف محلول الكولسميد الى الوسط الغذائي لكل طبق بحيث يكون تركيز الكولسميد النهائي 0.3 مايكروجرام/سم3 واتركها في الحاضنة لمدة 20 ساعة اخرى .

8 - أسحب الوسط الغذائي بماصة معقمة من الاطباق واغسل الشرائح الزجاجية بمحلول هانكس لعدة ثواني .

ملاحظـــة :

أضـف 15 سـم^3 من محلول هانكس لكل طبق . حرك المحلول لعدة ثواني ثم اسحبه بالماصة .

9 – أضـف 15 - 20 سـم^3 من محلول ملحي مخفف Hypotonic Solution الـى كل طبق . أترك المحلول لمدة 15 - 25 دقيقة .

ملاحظـــة :

فـترة تعـرض الخلايا الى المحلول الملحي المخفف خطوة حـرجة جـداً . لذا يجب الانتباه لذلك .

10 – أسـحب المحلول المحلي المخفف من الاطبـاق بماصـة معـقـمـة وبهـدوء دون رج الاطباق .

11 – أضـف 15 - 20سـم^3 من المحلول المثبت بهـدوء الى كل طبق . أترك المحلول لمدة 2 دقيقة ثم أسحب المحلول من الاطباق بهدوء .

12 – أعد الخطوة 11 مرة اخرى .

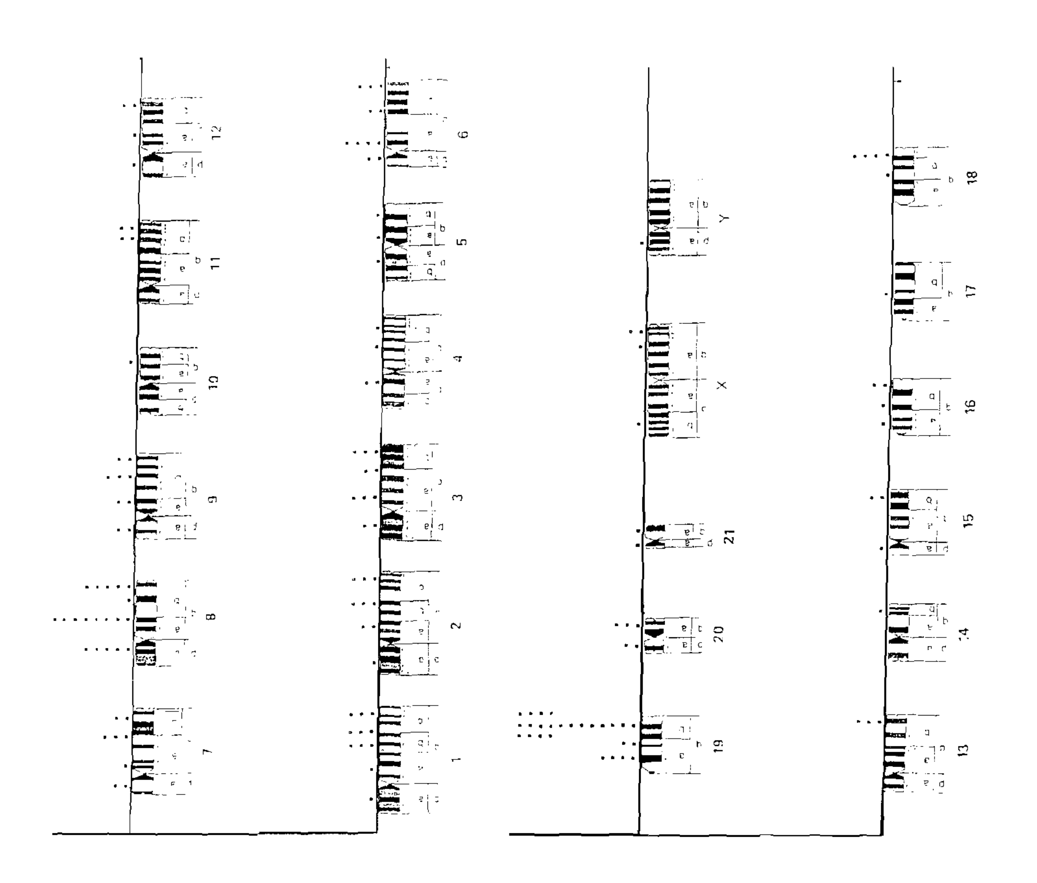
13 – أضف 15 - 20 سم^3 من المحلول المثبت الى كل طبق مرة ثالثة وأترك المحلول لمدة 30 دقيقة .

14 – تخلص من مـحلول الـتـثـبـيت وجـفف الـشـرائح بالـهـواء بوضـعـهـا بصـورة عمودية .

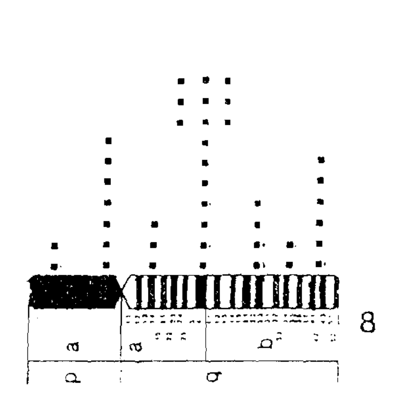
15 – أحفظ الشرائح لمدة 1 - 3 يوم قبل اجراء التهجين .

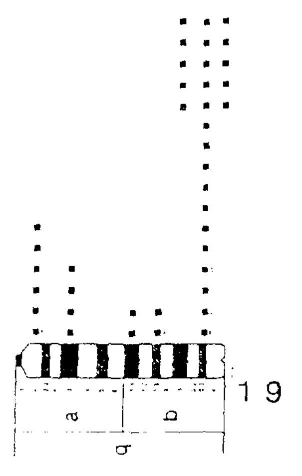
ملاحظـــة :

اتبع جـميع الخطوات الاخرى اعتباراً من المعاملة بالفورمامـيد حتى تظهير الهلام الفوتوغرافي كما سبق توضيحه في الطريقة الاولى .



شـكل : توزيع البقع الفضية او السوداء على كروموسومات الهامستر السوري عند استخدام المجس C - abl الموسم اشاعياً بنظير الهيدروجين - 3 (H^3) .





شـكل : توزيع البقع الفضية او السوداء على كروموسومي 8 و 19 السوري عند تهجين كروموسومات الهامستر السوري مع بمجس C - abl الموسم اشاعياً بنظير الهيدروجين (H^3) .

NUMBER OF GRAINS

Chromosome number	Mean length (um)	% of genome	Observed (O)	Expected (E)	(O - E) 2	X 2
1	9.44	7.07	10	10.225	0.050	4.9×10^{-3}
2	8.81	6.60	9	9.57	0.324	0.033
3	6.55	4.91	10	7.119	8.300	1.165
4	7.27	4.45	3	6.452	11.916	1.846
5	5.88	4.40	3	6.38	11.424	1.790
6	6.97	5.22	11	7.569	11.771	1.555
7	6.62	4.96	8	7.192	0.652	0.090
8	6.39	4.79	20	6.945	170.433	24.54**
9	5.94	4.45	7	6.452	0.300	0.046
10	4.58	3.43	1	4.973	15.784	3.174
11	5.64	4.22	4	6.119	4.49	0.733
12	5.45	4.08	4	5.916	3.671	0.620
13	5.28	3.89	3	5.771	7.678	1.330
14	4.29	3.74	1	5.423	19.562	3.607
15	4.36	3.26	3	4.727	2.982	0.630
16	4.01	3.00	4	4.35	0.122	0.028
17	4.18	3.13	1	4.538	12.517	2.758
18	3.76	2.81	5	4.074	0.857	0.210
19	4.34	3.25	26	4.712	453.178	96.175**
20	3.03	2.30	5	3.355	2.772	0.831
21	2.03	1.52	2	2.204	0.041	0.018
X	10.12	7.58	4	10.991	48.874	4.446
Y	7.68	5.75	1	8.337	53.831	6.456
Total	133.37	100	145			

** Statistically significant at $P<0.001$, df=1.

جدول : التحليل الاحصائي لاعداد البقع الفضية او السوداء على كروموسومات الهامستر السوري بعد تهجينها بمجس C - abl الموسم اشاعياً بنظير الهيدروجين الثالث (H^3) .

الفصل الثامن

بناء سلاسل الـ cDNA المتتمم من جزيئات mRNA

Synthesis of Complementary DNA (cDNA) from mRNA molecules

مقدمة

ان نسبة الحامض النووي DNA من مجموع الاحماض النووية في الخلايا يصل الى اكثر من 90% بينما تمثل كل أنواع الحامض النووي RNA ما تبقى من هذه النسبة وهو حوالي 10% .

لذلك فإنه من السهولة استخدام الحامض النووي المرسال mRNA لبناء نسخ DNA والحصول على المورثات وهو بذلك أفضل بكثير من محاولة الحصول على مورث من الـ DNA الذي يمثل كما قلنا 90% .

ان كمية الحامض النووي المرسال mRNA في الخلية تمثل مجموعة من الجزئيات التي استنسخت من المورثات التركيبية في الخلية . لذلك فإن نسبة عالية من هذه الجزيئات تعود لمورثات فعالة . ويعتبر استخلاص جزيئات الحامض النووي mRNA لمثل هذه المورثات أسهل بكثير من استخلاص جزيئات mRNA تعود لمورثات خاملة . ولكن في جميع الاحوال فإن استخدام الـ mRNA للحصول على المورثات هو أفضل وأسهل بكثير من استخدام الـ DNA .

محاليل

1 – محلول GIT :

47.2 غرام	Guanidine isothiocyaate
1 $سم^3$	Sodium acetate
100 $سم^3$	ماء مقطر معقم

أمزج المحلول جيداً حتى ذوبان ملح GIT ثم رشح المحلول عبر ورقة ترشيح IMM ثم أضف 1 $سم^3$ من 2 - mercapto ethanol . PH = 7.0

2 – محلول كلوريد السيزيوم STE :

95.97 غرام	CsCl	
100 $سم^3$	محلول STE	PH = 8.0

أمزج جيداً وعقم في جهاز التعقيم .

3 – محلول أسيتات الصوديوم 2M :

136 غرام	Sodium Acetate	
500 $سم^3$	ماء مقطر معقم	PH = 4.0

4 – محلول التحميل Loading buffer :

10 mM	Tris - Cl	
0.1 mM	EDTA	
0.5 M	Nacl	
%0.1	SDS	PH = 7.4

5 – محلول الغسيل Washing buffer :

10	mM	Tris - Cl	
0.1	mM	EDTA	
0.1	M	Nacl	
%0.1		SDS	PH = 7.4

6 – محلول Elution buffer :

10	mM	Tris - Cl	
0.1	mM	EDTA	
%0.1		SDS	PH = 7.4

7 – محلول داريء لانزيم الاستنساخ العكسي R T :

0.25	M	Tris - Cl	
0.375	M	Kcl	
15	m M	$Mgcl_2$	PH = 8.3
0.1	M	DTT	

8 – محلول داريء لانزيم Klenow fragmets : 10 x

0.5	M	Tris - Cl	
100	m M	$MgSo_4$	
10	m M	DTT	PH = 7.4

9 – محلول داریء لانزیم اللحام T4 Ligase (5x) :

0.25	M	Tris - Cl	
50	m M	$MgCl_2$	
5	m M	ATP	
50	m M	DTT	PH = 7.4

10 – محلول داریء لانزیم T4 Kinase (10 x) :

500	m M	Tris - Cl	
100	m M	$MgCl_2$	
50	m M	DTT	PH = 7.4

11 – محلول Sepharose elution buffer :

0.1	M	Nacl	
20	m M	Tris - Cl	
1	m M	EDTA	PH = 7.4

12 – محلول داریء لتفاعل السلسلة الثانية (4 x) :

8	مايكروليتر	2M Tris - Cl
4	مايكروليتر	IM $MgCl_2$
8	مايكروليتر	IM ammonium sulfate
80	مايكروليتر	IM KCL
4	مايكروليتر	Nuclease free BSA (10 مايكروجرام/مايكروليتر)
96	مايكروليتر	ماء مقطر معقم

PH = 7.4

استخلاص الحامض النووي الريبوزي الكلي Extraction of total RNA :

تعتبر عملية استخلاص الـ RNA من **أصعب طرق الاستخلاص نظراً لحساسية الحامض النووي** RNA للتحطم بالملوثات الكثيرة التي ترافق عملية الاستخلاص المعتادة . لذلك فإن عملية استخلاصه في جميع المراحل تتطلب تعقيم وتنظيف الادوات بشكل فائق هذا اضافة لتعقيم جميع المحاليل المستخدمة في عملية الاستخلاص .

لهذا السبب فإن أول عمل يجب القيام به هو تهيئة الادوات المعقمة والمحاليل المعقمة .

تغسل جميع الادوات الزجاجية من أنابيب وماصات ودوارق وغيرها في محلول مخفف من حامض الهيدروكلوريك أو الكبريتيك أو النتريك ثم بالماء المقطر المعقم سابقاً .

عقم الأدوات الزجاجية بعد غسلها بهيئة مجاميع ملفوفة بغشاء الالمنيوم بدرجة حرارة 150 - 200 مْ لمدة ثلاثة ساعات في فرن حراري أو في جهاز التعقيم بالبخار Autoclave تحت ضغط 15 باوند/١ انج بدرجة حرارة 120مْ لمدة نصف ساعة . أما بالنسبة للمحاليل التي لا يمكن تعقيمها في جهاز التعقيم بالبخار والتي تتضرر بالحرارة فانه يتم ترشيحها عبر مرشحات دقيقة .

كما يجب ارتداء معطف المختبر والكفوف المطاطية والنظارات الواقية وغطاء تغطية شعر الرأس والعمل في كابينات ذات اجواء معقمة .

ملاحظة :

يتم تعقيم الادوات البلاستيكية مثل أنابيب الطرد المركزي الفائق المصنوعة من نترات السليلوز عن طريق غسلها جيداً ثم غمرها بالحامض لفترة نصف ساعة وتجفيفها بعد ذلك وغسلها لعدة مرات بكحول الايثانول المطلق ثم تجفيفها قبل استخدامها .

الطريقة الاولى لاستخلاص الـ RNA الكلي :

1 – أنقل محلول الخلايا الى أنبوبة الطرد المركزي الفائق (أنبوبة نتروسليلوز أو أنبوبة كوركس Corex tube) المعاملة بمحلول 0.5 M EDTA .

2 – أضف محلول كلوريد السيزيوم + STE الى أنبوبة الطرد المركزي حتى نهايتها العلوية – تأكد من عدم وجود فقاعات ويمكن استخدام البرافين السائل في حالة الحاجة لذلك .

3 – أغلق أنبوبة الطرد المركزي بالسدادة المعدنية الخاصة بذلك وتأكد مرة ثانية من التخلص من جميع الفقاعات الهوائية .

4 – أطرد الانبوبة مركزياً في جهاز الطرد المركزي الفائق بقوة 50,000 دوره في الدقيقة لمدة 48 ساعة بدرجة حرارة 20 مْ .

5 – أفحص أنبوبة الطرد المركزي ستجد طبقة الـ RNA مترسبة في قعر أنبوبة الطرد المركزي .

6 – أسحب الراشح بواسطة ماصة .

7 – أقلب قنينة الطرد المركزي بحيث تكون فوهتها نحو الاسفل لعدم السماح للسائل المتبقي بالنزول على طبقة الـ RNA .

8 – أقطع أنبوبة الطرد المركزي بشفرة حادة وهي في الوضع السابق بحيث تحصل على الربع الذي يحتوي على طبقة الـ RNA .

ملاحظة :

هذه الخطوة لاجل عدم تلويث الـ RNA بسوائل الانبوبة .

9 – أضف 200 مايكروليتر ماء مقطر معقم الى طبقة الـ RNA . أمزج جيداً وأنقل محلول الـ RNA الى أنبوبة أبندروف معقمة ثم أضف 30 مايكروليتر من محلول أسيتات الصوديوم (3M) .

10 – أضـف 250 مايكروليتر من مزيج الفينول : كلوروفورم الى محلول الـ RNA . أمزج بهدوء .

11 – أطرد الانبوبـــة مركزياً في مايكروفيـــوج بقوة 2500 دوره في الدقيقـة لمـدة 5 دقائق .

12 – أنقل الراشح (محلول الـ RNA) الى أنبوبة أبندروف نظيفة .

13 – أضف 700 مايكروليتر مـــن الكحـــول الاثيلي المطلق المثـــلج الى محلول الـ RNA .

14 – أطرد الأنبوبة مركزياً بقوة 2500 دورة في الدقيقة لمدة 5 دقائق .

15 – تخلص من الراشح ، جـفف راسـب الـ RNA وأذب الراسـب بإضـافة 900 مايكروليتر من الماء المقطر المعقم .

16 – يمكن أخذ 2 مايكروليتر من محلول RNA وأحسب التركيز بإستخدام جهاز قياس الكثافة الضوئية بطول موجي 260 ناتوميتر .

17 – أحفظ نموذج الـ RNA بدرجة حرارة – 20 مْ حتى استخدامه .

الطريقة الثانية لاستخلاص الـ RNA الكلي :

1 – أمزج محلول الخلايا مع 8 سـم^3 من مـحلول GIT في أنبوبة طرد مركزي فائق .

2 – أضــف 3.3 ســم^3 من محلول كلوريد السيزيوم الى أنبوبة الطرد المركزي ثم أضف محلول GIT حتى نهاية أنبوبة الطرد لأجل التخلص من الهواء .

3 – أغلق الانبوبة جيداً وتأكد مرة اخرى من عدم وجود فقاعات هوائية .

4 – أطرد الانبوبة مركزياً بقوة 30,000 دوره في الدقيـقة لمدة 24 - 48 سـاعة بدرجة حرارة 20 مْ .

5 – أتبع الخطوات من 6 – 17 من الطريقة الاولى للإستخلاص .

طريقة فصل الـ mRNA من نموذج الـ RNA الكلي :

أولاً : تهيئة عمود الفصل Oligo - dT سليلوز :

1 - ثبت عمود الفصل على حامل حديدي في كابينة معقمة .

2 - أرفع الغطاء العلوي والسفلي للعمود وأسمح لمحلول الحفظ في المرور من نهاية العمود .

3 - أضف الى العمود 5 سم3 من محلول 5 mM EDTA + 0.1 M NaoH (أسمح للسائل بالمرور لغسل العمود) .

4 - أغسل العمود بإضافة 3سم3 ماء مقطر معقم .

5 - أضف 5 سم3 من محلول التحميل Loading buffer الى عمود الفصل لأجل تنظيم الاس الحامضي في العمود .

ملاحظـــة :
- يجب أن يكون الأس الحامضي PH للعمود بعد الخطوة الخامسة يســـاوي 7 - 8 ويمكن معرفة ذلك بقياس الأس الحامضي بمحلول التحميل الخارج من نهاية العمود . ويمكن إعادة الخطوة الرابعة والخامسة حتى الحصول على الاس الحامضي المناسب .
- أسمح لمحاليل الغسيل والتوازن بالمرور عبر العمود وتخلص منها بعد ذلك .

ثانياً : فصل الـ mRNA :

1 - أضف 12 سم3 من محلول SDS 10% الى نموذج الـ RNA الكلي الذي تم استخلاصه سابقاً الخطوة 15 ليصبح الحجم الكلي 1000 مايكروليتر (1 سم3) .

2 – سخن محلول الـ RNA الكلي الى درجة حرارة 70ْم لمدة 5 دقائق .

3 – أضف 100 مايكروليتر من محلول 5 M Nacl الى محلول الـ RNA الكلي وأترك المحلول يبرد بدرجة حرارة الغرفة .

4 – أضف محلول الـ RNA الكلي الى عمود الفصل وأجمع المحلول النازل من أسفل العمود في أنبوبة أبندروف نظيفة معقمة .

5 – سخن المحلول الذي جمعته في الخطوة 4 بدرجة حرارة 70ْم لمدة 5 دقائق ثم أضفه الى عمود الفصل .

> **ملاحظة :**
>
> تخلص من السائل النازل من نهاية العمود بعد الخطوة 5 لعدم الحاجة اليه .

6 – أضف 10 سم3 من محلول الغسيل Wash buffer الى عمود الفصل وتخلص من السائل النازل من نهاية العمود لعدم الحاجة اليه .

7 – أضف 2.5 سم3 من محلول الاستخلاص Eluting buffer الى عمود الفصل وأجمع السائل النازل من نهاية العمود في 9 أنابيب أبندروف نظيفة معقمة (أجمع في الانبوبة الواحدة من 200 - 250 مايكروليتر = حوالي 10 قطرات) .

8 – أجمع محتويات الأنابيب من الثانية الى السابعة في أنبوبة واحدة وأضف اليه 130 مايكروليتر من محلول أسيتات الصوديوم 3M .

9 – أمزج جيداً ثم أضف 2.5 حجم من كحول الأيثانول المطلق المثلج . أمزج بالتقليب الهادىء وأحفظ الأنبوبة بدرجة حرارة – 20 لمدة نصف ساعة .

10 – أطرد الأنبوبة مركزياً بقوة 2500 دوره في الدقيقة لمدة 10 دقائق بدرجة حرارة 4 مْ .

11 - تخلص من الراشح ، جفف الراسب وأعد اذابته بإضافة 100 مايكروليتر من الماء المقطر المعقم .

12 - أحسب تركيز الـ mRNA في النموذج بإستخدام جهاز قياس الكثافة الضوئية عند طول موجي 260 نانوميتر .

13 - أجعل تركيز الـ mRNA في المحلول 1 مايكروجرام/مايكروليتر عن طريق الترسيب بالكحول والاذابة بالماء المقطر .

ملاحظـــة :
يمكن عمل هجرة كهربائية لنموذج صغيرة من محلول الـ mRNA عبر هلام الاجاروز + بروميد الاثيديوم أو الاجاروز + فورمالديهايد للتأكد من نجاح الاستخلاص عبر عمود الفصل .

بنـــاء cDNA بإستخدام mRNA كقالب :

أستخدام أنابيب معاملة بالسليكون في هذه الطريقة وفي حالة عدم توفرها أغسل أنابيب أبندروف أو غيرها بمحلول السليكون ، جفف ثم عقم بعد ذلك .

أولاً : بناء السلسلة الاولى من الـ cDNA :

1 - خذ 5 مايكروليتر (5 مايكروجرام) من محلول الـ mRNA الذي تم تحضيره في الخطوة 13 من طريقة فصل الـ mRNA وضعها في أنبوبة أبندروف معاملة بالسليكون .

2 - أضف 5 مايكروليتر من البادئة المناسبة بتركيز 0.1 مايكروجرام/مايكروليتر الى أنبوبة محلول الـ mRNA .

3 - أحضن المزيج بدرجة حرارة 70ْم لمدة 3 دقيقة ثم أنقله الى حمام ثلجي لمدة 5 دقائق .

4 – أضف ما يلي الى أنبوبة محلول الـ mRNA :

20	مايكروليتر	محلول دارىء لانزيم الاستنساخ العكسي 5 x
10	مايكروليتر	محلول 0.1 M DTT
10	مايكروليتر	محلول 10 mM dNTP
2	مايكروليتر	محلول RNasin (30 وحدة/مايكروليتر)
1	مايكروليتر	Nuclease - free BSA (1 مايكروجرام/مايكروليتر)
42	مايكروليتر	ماء مقطر معقم
5	مايكروليتر	أنزيم الاستنساخ العكسي (200 وحدة/مايكروليتر)

أمزج محتويات التفاعل جيداً ثم احضن بدرجة حرارة 42مْ لمدة ساعة واحدة .

5 – أضف 5 مايكروليتر من محلول 0.5 M EDTA الى محلول التفاعل .

6 – أضف 100 مايكروليتر من مزيج الفينول : كلوروفورم الى محلول التفاعل ، أمزج جيداً .

7 – أطرد انبوبة الاستخلاص مركزياً بقوة 2500 دوره في الدقيقة لمدة 5 دقائق .

8 – أنقل الطبقة العلوية (طبقة التفاعل) الى أنبوبة ابندروف نظيفة ثم أضف اليها 100 مايكروليتر من محلول الكلوروفورم .

9 – أمزج جيداً وأطرد أنبوبة الاستخلاص مركزياً كما في الخطوة 7 .

10 – أنقل الطبقة العلوية الى أنبوبة نظيفة ثم أضف اليها 170 مايكروليتر من الماء المقطر المعقم + 30 مايكروليتر من محلول اسيتات الصوديوم 3M . أمزج جيداً .

11 – أضف 750 مايكروليتر من كحول الايثانول المطلق المثلج الى أنبوبة المزيج في الخطوة 10 . أمزج جيداً واحفظ أنبوبة المزيج بدرجة حرارة – 20مْ لمدة نصف ساعة .

12 – أطرد الانبوبة مركزياً بقوة 2500 دورة في الدقيقة لمدة 10دقائق .

13 – تخلص من الراشح وأغسل الراسب بإضافة 500 مايكروليتر من الكحول الاثيلي 80% المثلج .

14 – أطرد الانبوبة مركزياً كما في الخطوة 12 .

15 – تخلص من الراشح ، جفف الراسب وأذبه بإضافة 50 مايكروليتر من الماء المقطر المعقم .

ثانياً : بناء السلسلة الثانية من الـ cDNA :

1 – أضف الى محلول السلسلة الاولى (خطوة رقم 15 من طريقة بناء السلسلة الاولى) المحاليل التالية :

25	مايكروليتر	محلول دارىء لتفاعل السلسلة الثانية 4 x
4	مايكروليتر	محلول dNTP (10 mM)
11	مايكروليتر	ماء مقطر معقم
2	مايكروليتر	محلول RNase H (2 وحدة/مايكروليتر)
8	مايكروليتر	أنزيم البلمرة DNA Pol I (40 وحدة)

أمزج جيداً وأحضن التفاعل بدرجة حرارة 14مْ لمدة 2 ساعة .

2 – أضــــف 4 مايكروليتر محلول 0.5M EDTA + 100 مايكروليتر فينول الى محلول التفاعل . أمزج جيداً .

3 – أطرد أنبوبة التفاعل مركزياً بقوة 2500 دورة في الدقيقة لمدة 5 دقائق .

4 – أنقل الطبقة العلوية الى أنبوبة أبندروف نظيفة ومعقمة وأضف 100 مايكروليتر من الكلوروفورم . أمزج جيداً .

5 – أطرد الانبوبة مركزياً كما في الخطوة رقم 3 .

6 – أنقل الطبقة العلوية الى أنبوبة نظيفة (محلول السلسلة الثانية) .

7 – أنقل محلول السلسلة الثانية الى عمود الفصل G50 - Spin column وثبت العمود داخل أنبوبة طرد مركزي لكي يتم تجميع المحلول النازل من نهاية العمود عند الطرد .

8 – أطرد مركزياً بقوة 1000 دوره في الدقيقة لمدة 5 دقائق .

9 – أجمع المحلول النازل من عمود الفصل في أنبوبة نظيفة وأضف 100 مايكروليتر محلول TE الى عمود الفصل .

10 – أطرد مركزياً كما في الخطوة 8 .

11 – أجمع المحلول النازل من عمود الفصل وأضفه الى الانبوبة الاولى في الخطوة 9 .

12 – أضف الى محلول السلسلة الثانية الذي يتم جمعه من الخطوتين 9 و11 المحاليل التالية :

2	مايكروليتر	محلول Yeast tRNA (10 مايكروجرام)
20	مايكروليتر	محلول أسيتات الصوديوم 3M
28	مايكروليتر	ماء مقطر معقم
500	مايكروليتر	كحول الايثانول المطلق

أمزج جيداً ثم ضع أنبوبة المحلول بدرجة حرارة – 20 مْ لمدة 30 دقيقة .

13 – أطرد الانبوبة مركزياً بقوة 2500 دورة في الدقيقة لمدة 5 دقائق .

14 – تخلص من الراشح وأغسل الراسب بإضافة 100 مايكروليتر من الكحول الاثيلي 80%

15 – تخلص من الكحول بالطرد المركزي كما في الخطوة 13 .

16 – جفف الراسب بالهواء وأذبه بإضافة 30 مايكروليتر من الماء المقطر المعقم .

17 – أحسب تركيز الـ cDNA في المحلول بإستخدام جهاز قياس الكثافة الضوئية عند طول موجي 260 ناتوميتر .

18 – التموذج الان يمثل محلول cDNA مزدوج الشريط ذو نهايات عمياء غير لزجة .

ان نمـوذج الـــ cDNA ، المزدوج الشريط الذي تم تحضيره خلال التفاعلات السابقة غير صالح في عمليات الهندسة الوراثية ذلك أن الاشرطة المزدوجة للـ cDNA تفتقد لمجموعة فوسفات في النهاية الخامسة للشريط الأول علاوة على امتلاكها لنهايات عمياء ووجود أشرطة cDNA قصيرة جداً . لذلك فإنه يتوجب تحوير نهايات جزيئات الـ cDNA لجعلها مناسبة لعمليات الهندسة مع ناقل معين .

فسفرة النهاية الخامسة للسلسلة الأولى :

1 – أضف الى محلول جزيئات الـ cDNA (الخطوة 16 من طريقة بناء السلسلة الثانية) المحاليل التالية :

6	مايكروليتر	محلول داریء لانزيم البلمرة Klenow fragment
3	مايكروليتر	محلول dNTP
6	مايكروليتر	محلول داریء لانزيم T4 Kinase
2	مايكروليتر	أنزيم Klenow fragment
2	مايكروليتر	أنزيم T4 Polynucleotide Kinase
11	مايكروليتر	ماء مقطر معقم

أحضن التفاعل بدرجة حرارة 37.5 مْ لمدة نصف ساعة .

2 – أضـــف 2 مايكروليتر من محلول 0.5 M EDTA + 70 مـايكروليـتر من مـزيج الفينول : كلوروفورم الى محلول التفاعل . أمزج جيداً .

3 – أطرد الانبوبة مركزياً بقوة 2500 دوره في الدقيقة لمدة 5 دقائق .

4 – أنقل الطبقة العلوية الى أنبوبة أبندروف نظيفة وأضف اليها 100 مايكروليتر من الكلوروفورم . أمزج جيداً وأطرد الانبوبة مركزياً كما في الخطوة 3 .

5 – أنقل الطبقة العلوية الى أنبوبة أبندروف نظيفة وأضف اليها :

113	مايكروليتر	ماء مقطر معقم
20	مايكروليتر	أسيتات الصوديوم 3M
500	مايكروليتر	كحول أثيلي مطلق مثلج

أمزج جيداً وضع الانبوبة بدرجة حرارة – 20 مْ لمدة 15 دقيقة .

6 – أطرد الانبوبة مركزياً بقوة 2500 دوره في الدقيقة لمدة 5 دقائق . تخلص من الراشح .

7 – اغسل الراسب بإضافة 500 مايكروليتر كحول أثيلي 80% .

8 – أطرد الانبوبة مركزياً كما في الخطوة 6 .

9 – تخلص من الراشح وجفف الراسب بالهواء .

10 – أذب الراسب بإضافة 10 مايكروليتر من الماء المقطر المعقم .

ربط توصيلة Eco RI الى نهايات جزيئات الـ cDNA :

11 – أضف المحاليل التالية الى محلول الخطوة 10 (الخطوة السابقة) :

4	مايكروليتر	Eco RI adaptor (4 مايكروجرام)
4	مايكروليتر	محلول دارىء لانزيم اللحام T4 Liagse
2	مايكروليتر	أنزيم T4 Liagase

أمزج جيداً وأحضن بدرجة حرارة 15مْ لمدة 24 ساعة .

12 – أحضن التفاعل مرة اخرى بدرجة حرارة 70مْ لمدة 15 دقيقة .

فسفرة النهاية الخامسة للتوصيلات المرتبطة مع جزيئآت الـ cDNA :

13 – أضف المحاليل التالية الى محلول الخطوة 12 :

4	مايكروليتر	ماء مقطر معقم
1	مايكروليتر	محلول دارىء لانزيم اللحام T4 Kinase
2	مايكروليتر	محلول 10 mM ATP
3	مايكروليتر	أنزيم T4 Polyuncleotide Kinase

أحضن التفاعل بدرجة حرارة 37.5 مْ لمدة نصف ساعة .

14 - أضف الى محلول التفاعل 2 مايكروليتر من محلول 0.5 M EDTA وأحضن بعد ذلك بدرجة حرارة 70مْ لمدة 15 دقيقة .

15 - أضـــف 20 مايكروليتر من الماء المقطر المعقم الى محلول التفاعل ليصبح حجم المحلول 50 مايكروليتر .

تنقية نموذج الـ cDNA :

حضر عمود الفصل Sepharose Cl - 4B كالتالي :

- ثبت العمود بحامل حديدي .

- أغسل عمود الفصل بإضافة 5 سـم3 من محلول التحميل Elution Buffer . تخلص من المحلول النازل من نهاية العمود .

1 - أضف محلول نموذج الـ cDNA (الخطوة 15 السابقة) الى عمود الفصل . أترك النموذج يتغلغل في العمود .

2 - أضـف 1.2 سـم3 من محلول التحميل الى عمود الفصل قطره قطره واجمع المحلول النازل من نهاية العمود في ثلاثة أنابيب أبندروف (10 قطرات لكل أنبوبة = 42 مايكروليتر) .

3 - أفحص محاليل الأنابيب الثلاثة لمعرفة وجود الاشرطة القصيرة (أقل من 500 زوج قاعدي) عن طريق الهجرة الكهربائية لـ 2 مايكروليتر من كل أنبوبة عبر هلام الاجاروز 2% مع وجود قطع DNA قياسية (Marker) .

4 – اعتماداً على نتائج الهجرة الكهربائية تخلص من الأنبوبة التي تحتوي على محلول قطع قصيرة من الـ cDNA عالية التركيز .

5 – أجمع محاليل الأنابيب مناسبة سوية في أنبوبة واحدة وأضف اليه 1 مايكروليتر من محلول Yeast tRNA (10 مايكروجرام) + 0.1 حجماً من محلول استيتات الصوديوم (3M) + 2 حجماً من كحول الايثانول المطلق المثلج .

6 – أمزج جيداً ثم احفظ الانبوبة بدرجة حرارة – 20مْ لمدة 15 دقيقة .

7 – أطرد الانبوبة مركزياً بقوة 2500 دوره في الدقيقة لمدة 10 دقائق . تخلص من الراشح .

8 – أغسل الراسب بإضافة 50 مايكروليتر من الكحول الاثيلي 80% .

9 – أطرد الانبوبة مركزياً كما في الخطوة 7 .

10 – تخلص من الراشح ، جفف الراسب وأذبه بإضافة 10 مايكروليتر من الماء المقطر المعقم .

11 – أحسب تركيز الـ cDNA في المحلول وأحفظ النموذج بدرجة حرارة – 20 مْ .

12 – النموذج جاهز الان للكلونة مع ناقل مناسب .

ملاحظة :

يمكن استخدام طرق تحضير اشرطة cDNA لبناء مجس cDNA موسم اشعاعياً عن طريق اضافة نيوكليوتيدات موسمة اشعاعياً في تفاعلات البناء .

الفصل التاسع

بناء مكتبات المورثات

Establishment of genes Libraries

مقدمة

ان بناء المكتبات الوراثية يستهدف تمثيل مورثات الكائنات في المكتبة بنسبة عالية . وعند الحاجة لايجاد مورث معين فإنه يمكن استخدام قطع الـ DNAالمتوفرة في المكتبة للبحث عنه . ان من المفترض أن تكون احتمالية وجود أي مورث يعود للكائن عالية جداً ولا تقل في أسوأ الاحوال عن 90% .

ولا يقتصر بناء المكتبات الوراثية على الجينات Genomes بل يمكن بناءها لمورث معين أو بإستخدام cDNA .

تستخدم العديد من النواقل في عملية بناء المكتبات الوراثية ويعتمد نوع الناقل في العادة على الهدف من بناء المكتبة . كما أن حجم قطع الـ DNA التي تستخدم في بناء النواقل الهجينة يعتمد أيضاً على عوامل منها مدى تعقيد مجين الكائن الحي المطلوب بناء مكتبة وراثية له وكذلك نوع الناقل . فالجينات المعقدة التي تعود الى الاحياء الراقية تحتاج الى قطع DNA كبيرة الحجم 10 - 50 كيلو قاعدة لأجل تمثيل معظم مورثاتها فيما تستخدم قطع صغيرة من الـ DNA في تمثيل الجينات البسيطة .

ويمكن حساب حجم المكتبة المطلوبة لتمثيل مورثات مجين معين اعتماداً على الاحتمالية المطلوبة وكالتالي :

$$N = \frac{\ln(1 - P)}{\ln(1 - 1/n)}$$

N = عدد النواقل المهندسة (الهجينة) في البنك اللازمة لتمثيل معظم مورثات المجين .

n = نسبة معدل حجم قطع الـ DNA المستخدمة في الهندسة الى حجم مجين الكائن الحي .

P = احتمالية وجود مورث ما في المكتبة .

مثلاً 95% أو 98%

راجع الجدول التالي لمعرفة حجم المكتبات اللازمة لمجموعة من الاحياء .

جـدول : عدد المكلونات (النواقل الهجينة) اللازمة لتمثيل مورثات عـدد من مجينات الكائنات الحية في مكتبات المورثات .

الكائـــــــن	حجـــــم الجيـــــن	عدد الكلونات اللازمة في المكتبة عند استخدام قطع DNA بمعدل 17 كيلو قاعدة
E. Coli	4×10^{6}	700
Bacillus megaterium	3×10^{7}	5300
Aspergilus nidulans	4×10^{7}	7000
Saccharomyces cerevisiae	7×10^{7}	12500
Drosophila melanogaster	8×10^{7}	14100
Tomato	7×10^{8}	125000
Man	3×10^{9}	535000
Frog	2.3×10^{10}	428000

بناء مكتبة مورثات بإستخدام العائي EMBL4 :

أولاً : تحضير قطع DNA بحجم 10 - 20 كيلو قاعدة :

1 - استخلص الـ DNA اللازم من الخلايا المطلوب بناء مكتبة لمورثاتها حسب الطريقة الخاصة بذلك .

2 - خذ 100 مايكروجرام من الـ DNA وعامله بأنزيم القطع ECOR 1 كما في طريقة التفاعل الخاصة بذلك .

3 - حلل نتائج المعاملة مع الانزيم بإستخدام الهجرة الكهربائية عبر هلام الاجاروز الخفيف Low Melting piont agarose مع قطع DNA قياسية .

4 - اصبغ الهلام بمحلول بروميد الاثيديوم وعن طريق الاشعة الفوق بنفسجية حدد موقع قطع الـ DNA التي يتراوح حجمها ما بين 10 - 20 كيلو قاعدة مستعيناً بقطع الـ DNA القياسية .

5 - أقطع الهلام حول قطع الـ DNA المناسبة الحجم بإستخدام شفرة حادة وأنقل الهلام الى أنبوبة أبندروف نظيفة .

6 - تخلص من الهلام عن طريقة هرسه داخل الانبوبة ثم إضافة 3 مايكروليتر من محلول دارىء لانزيم الاجاريز Agarase و 20 وحدة من أنزيم الاجاريز + 50 مايكروليتر من الماء المقطر .

6 - استخلص قطع الـ DNA التي يتراوح حجمها بين 10 - 20 كيلو قاعدة من محلول التفاعل بإضافة 200 مايكروليتر من كحول الايثانول المطلق المثلج . أمزج جيداً .

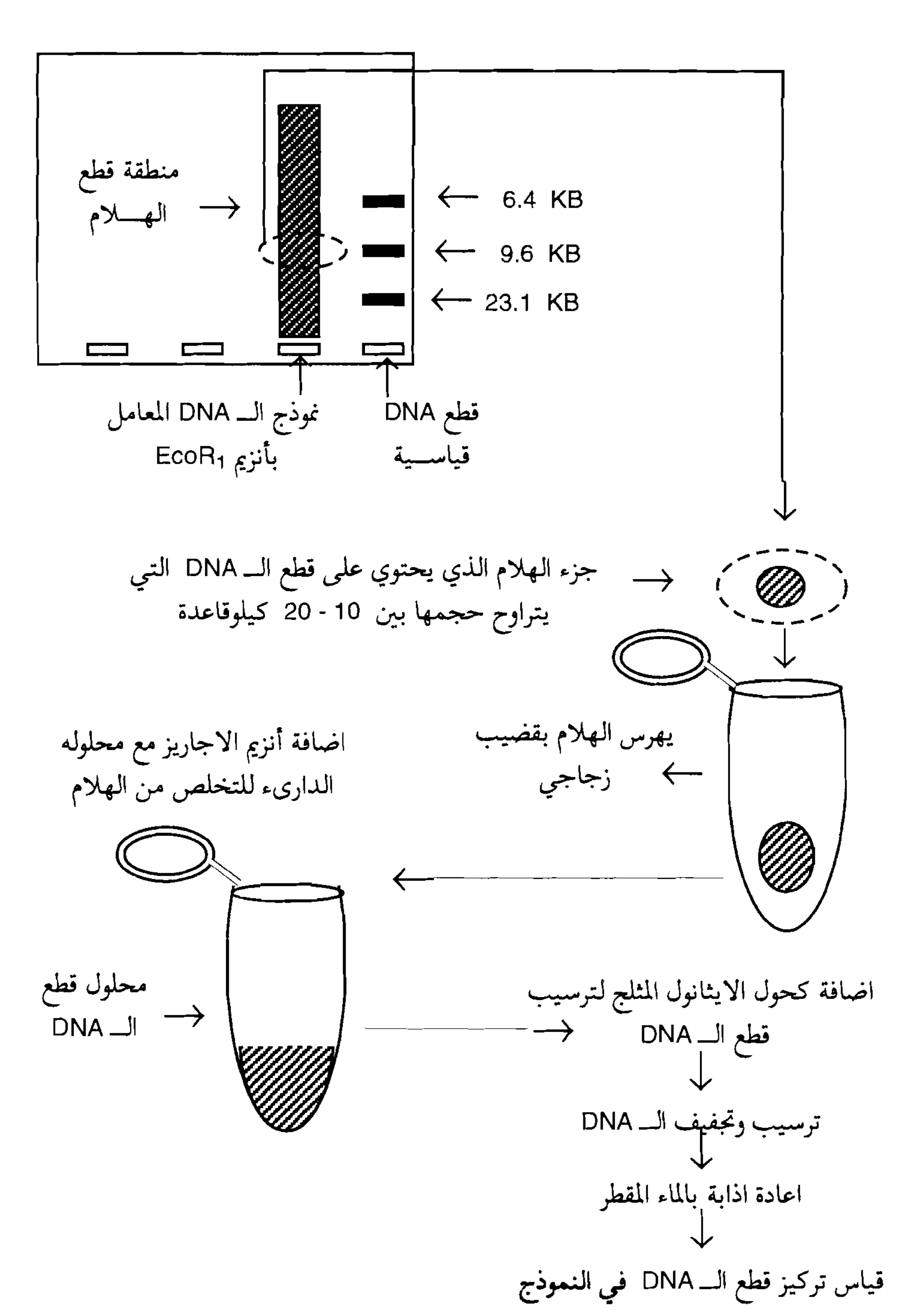
7 - أحضن الانبوبة بدرجة حرارة – 20 مْ لمدة 20 دقيقة ثم رسب قطع الـ DNA بالطرد المركزي بقوة 2500 دوره بالدقيقة لمدة 5 دقائق .

8 – تخلص من الراشـــح وجفف الراسب ثم اذبـــه بإضافة 15 مايكروليتر من الماء المقطر .

9 – أحسب تركيز قطع الـ DNA في المحلول (شكل 9 - 1) .

ملاحظـــة :

يمكن استـخدام الهجـرة الـكهربائيـة عـبر هلام الاجاروز للتأكـد من حجم قطع الـ DNA المستخلصة .



شكل 9 - 1 : تهيئة قطع DNA بحجم 10 - 20 كيلو قاعدة اللازمة لعملية الهندسة مع ناقل .

ثانياً : هندسة قطع الـ DNA (10 - 20 كيلو قاعدة) مع العاثي EMBL4 :

1 – في أنبوبة أبندروف جهز التفاعل التالي :

0.5	مايكروجرام	قطع DNA (10 - 20 كيلو قاعدة)
1	مايكروجرام	الناقل EMBL4
2	مايكروليتر	محلول دارىء لانزيم اللحام T4 Liagase
4	وحدات	أنزيم اللحام T4 Liagase

يجب أن يكون حجم محلول التفاعل 5 مايكروليتر .

2 – أحضن التفاعل بدرجة حرارة 25مْ لمدة نصف ساعة .

3 – **تعبئة العاثيات In Vitro packaging :**

يجب أن تجرى هذه العملية بسرعة ما أمكن دون السماح لنماذج العمل بالذوبان بشكل نهائي .

أ – أذب محلول Sonic extracts بوضع الانبوبة الخاصة به بين الأصابع لمدة 1 - 2 دقيقة ثم احفظها في الثلج .

ب – أذب محلول Freezer / Thaw extracts بين الاصابع وبمجرد ذوبانه أضف اليه وبسرعة 10 مايكروليتر من محلول قطع الـ DNA (10 - 20 كيلو قاعدة) واحفظ الانبوبة في الثلج .

جـ – خذ 15 مايكروليتر من محلول Sonic extracts وأضفه الى أنبوبة مزيج Freezer / Thaw + قطع الـ DNA .

د – أطرد الانبوبة مركزياً بقوة 1000 دورة لعدة ثوان .

هـ – أحضن الانبوبة بدرجة حرارة 22مْ لمدة 2 ساعة .

و – أضف الى أنبوبة التفاعل 0.5 سم3 من محلول SM + 20 مايكروليتر من الكلوروفورم (محلول العاثيات) .

ز – خـــذ 10 مايكروليتر من محلول العاثيات واحسب حجم وكفاءة التعبئة (حجم المكتبة Library titer) وأحفظ محلول العاثيات المتبقي (المكتبة) بدرجة حرارة 4مْ .

حساب حجم وكفاءة التعبئة Library titer :

1 – حضر التخافيف 10^{-1} - 10^{-4} من محلول العاثيات ثم أنقل 100 مايكروليتر من كل تخفيف الى أنبوبة زجاجية نظيفة واستخدمها في الخطوة التالية .

2 – أضف الى كل انبوبة من أنابيب تخافيف العاثيات 200 مايكروليتر من مزرعة بكتريا القولون E.coli P2392 عمر 24 ساعة وذات كثافة ضوئية عند طول موجي 600 ناتوميتر = 0.5 .

3 – أمزج محاليل العاثيات + البكتريا وأحضنها لمدة نصف ساعة بدرجة حرارة 37.5مْ .

4 – أضف الى كل أنبوبة من أنابيب مزيج العاثيات والبكتريا 3 سم^3 من الوسط الغذائي نصف الصلب الدافيء LB top agar .

5 – أمزج بسرعة وصب محتويات كل أنبوبة على سطح وسط غذائي LB صلب في أطباق بتري . أترك الاطباق لنصف ساعة بدرجة حرارة الغرفة . استخدم ثلاثة أطباق لكل تخفيف .

6 – احضن أطباق الاوساط الغذائية بدرجة حرارة 37.5 مْ لمدة 24 ساعة .

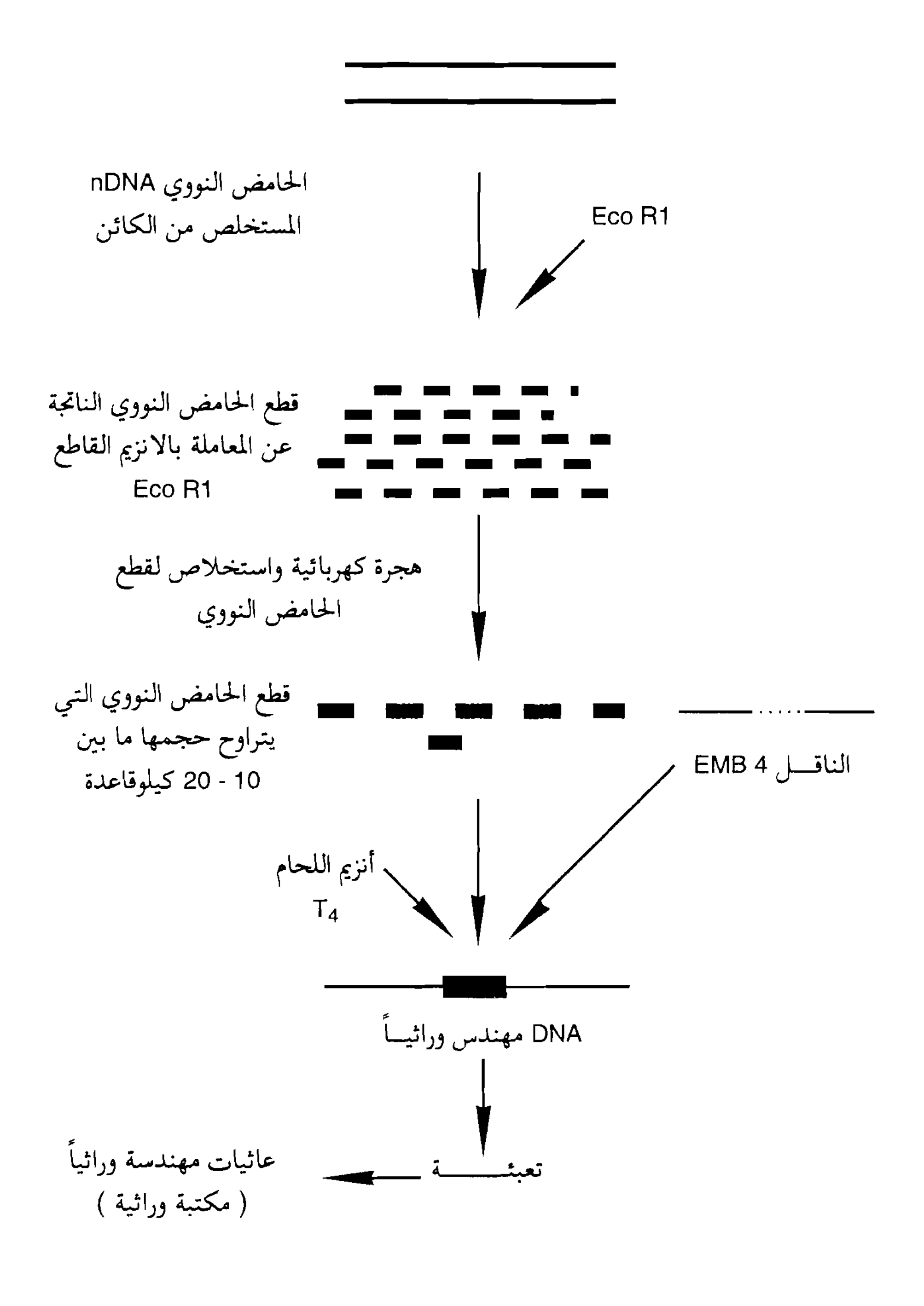
7 – أحسب عدد مستعمرات العاثيات في أفضل المزارع نمواً ووضوحاً وفي تخفيف معين .

وبالرجوع الى التخفيف الاصلي المستخدم يمكن حساب كفاءة التعبئة .

ملاحظـــة :

- لا تنسى أنك استـخـدمت 10 مايكروليتـر من محلول العـائيات لتحضير التخافيف 10^{-1} - 10^{4} .

- يمكـن أخـــــذ 10 مايكروليتـر من محلول العـاثيات وتحليلها عبـر الـهجرة الكهربائية مع وجـود نموذج ناقل EMBL4 غيـر مكلون وقطع DNA قيـاسيـة لمعرفة متوسط استيعاب القطع المكلونة .
- يمكـن زيادة كـفـاءة التـحـام قطع الـ DNA (10 - 20 كـيـلو قـاعـدة) مع أذرع النـاقل EMBL4 وذلك بتنقيـة الاذرع اليـمين واليسار والتخلص من الحشوة الداخلية عن طريق الهـجرة الكهربائية عبر هلام الاجاروز الخفيف ثم قطع مناطق الاذرع اليمين واليسار وتنقيتها ثم استخدامها (شكل 9 - 2) .



شكل 9 - 2 : استراتيجية الهندسة الوراثية المستخدمة في بناء مكتبة المورثات بإستعمال العاثي لامبـدا EMBL 4

بناء مكتبة مورثات بإستخدام البلازميد PBR 322

1 – استخلص الـ DNA اللازم من الخلايا المطلوب بناء مكتبة مورثات لها .

2 – خذ 100 مايكروجرام من الـ DNA وعاملة بأنزيم القطع Bam H1 .

3 – حلل نتائج المعاملة بالانزيم القاطع بالهجرة الكهربائية عبر هلام الاجاروز الخفيف مع قطع DNA قياسية .

4 – أصبغ الهلام بمحلول بروميد الاثيديوم وعن طريق الاشعة فوق البنفسجية حدد موقع قطع الـ DNA التي يتراوح حجمها ما بين 8 - 10 كيلو قاعدة .

5 – استخلص قطع الـ DNA التي يتراوح حجمها ما بين 8 - 10 كيلو قاعدة بالطريقة التي تم شرحها سابقاً .

6 – حضر التفاعل التالي في أنبوبة تفاعل نظيفة :

5 مايكروليتر محلول البلازميد PBR 322 (0.5 مايكروجرام/مايكروليتر)

3 مايكروليتر محلول دارىء للانزيم Bam H1

2 مايكروليتر محلول انزيم Bam H1(10 وحدات) .

40 مايكروليتر ماء مقطر معقم

أمزج جيداً ثم أحضن التفاعل بدرجة حرارة 37.5 مْ لمدة ساعة واحدة .

7 – أحضن التفاعل مرة أخرى بدرجة حرارة 50مْ لمدة 20 دقيقة .

8 – أضف 100 مايكروليتر من الماء المقطر المعقم الى أنبوبة التفاعل + 200 مايكروليتر من مزيج الفينول :كلوروفورم .

9 – آمزج جيداً وأطرد الانبوبة مركزياً بقوة 2500 دوره في الدقيقة لمدة 5 دقائق .

10 – أنقل الطبقة العلوية (طبقة البلازميد) الى أنبوبة أبندروف نظيفة وأضف اليها 150 مايكروليتر من الكلوروفورم .

11 – أمزج جيداً ثم أطرد الانبوبة مركزياً كما في الخطوة 9 .

12 – أنقل الطبقة العلوية (طبقة البلازميد) الى أنبوبة جديدة .

13 – أضـــف 10 مايكروليتر من محلول أسيتات الصوديوم 3M الى مــحلول البلازميد + 250 مايكروليتر من كحول الايثانول المطلق المثلج . أمزج جيداً وأحفظ بدرجة حرارة – 20مْ لنصف ساعة .

14 – أطرد الانبوبة مركزياً بقوة 2500 دوره في الدقيقة لمدة 10 دقائق لترسيب DNA البلازميدات .

15 – تخلص من الراشح ، جفف الراسب ثم أذبه بإضافة 20 مايكروليتر من الماء المقطر المعقم .

16 – في أنبوبة تفاعل جهز التفاعل التالي :

1	مايكروجرام	البلازميد pBR 322 المفتوح بالانزيم BamH1 (الخطوة 15)
0.5	مايكروجرا	قطع الـ DNA (8 - 10 كيلو قاعدة) (الخطوة 5) .
1	مايكروليتر	محلول دارىء لانزيم اللحام T4 Ligase
1	مايكروليتر	أنزيم T4 Ligase (4 وحدات) .

يجب أن يكون حجم التفاعل 5 مايكروليتر . احضن التفاعل بدرجة حرارة 25مْ لدة نصف ساعة ثم بدرجة حرارة 50مْ لمدة 20 دقيقة أخرى .

17 – أضف 95 مايكروليتر من الماء المقطر المعقم الى أنبوبة التفاعل ليصبح الحجم الكلي لمحلول التفاعل 100 مايكروليتر .

18 – أضـــف 100 مايكروليتر من مزيج الفينول : كلورفورم الى محلول التفاعل . أمزج جيداً .

19 – أطرد انبوبة التفاعل مركزياً بقوة 2500 دورة في الدقيقة لمدة 5 دقائق .

20 – أنقل الطبقة العلوية (طبقة البلازميدات الهجينة) الى أنبوبة نظيفة ثم اضف اليه 100 مايكروليتر من الكلوروفورم . أمزج جيداً .

21 – أطرد الانبوبة مركزياً كما في الخطوة 19 .

22 - أنقل الطبقة العلوية الى أنبوبة نظيفة ثم أضف اليها 10 مايكروليتر من محلول أسيتات الصوديوم 3M + 250 مايكروليتر من كحول الايثانول المطلق الثلجي . أمزج جيداً وأحفظ الانبوبة بدرجة حرارة - 20مْ لمدة نصف ساعة .

23 - أطرد الانبوبة مركزياً بقوة 2500 في الدقيقة لمدة 10 دقائق .

24 - تخلص من الراشح ، جفف الراسب ثم أذبه بإضافة 50 مايكروليتر من الماء المقطر المعقم (محلول البلازميدات الهجينة) .

25 - أحسب كفاءة الهندسة الوراثية للبلازميد استناداً الى الطريقة التالية (حساب كفاءة الكلونة) .

حساب كفاءة الكلونة

أستخدم في عملية الحساب البكتريا E.coli HB 101

أولاً : تأهيل البكتريا Competency of Bacteria E. coli HB 101

1 - أنقل مستعمرة واحد من البكتريا E.coli HB 101 (أو 0.5 سم3 في حالة وجودها على هيئة محلول) الى أنبوبة زراعة تحتوي على 10 سم3 من الوسط الغذائي LB السائل (بروث Broth) .

2 - أحضن المزرعة بدرجة حرارة 37.5 مْ لمدة 24 ساعة في حاضنة هزازة عند قوة هز 150 دوره في الدقيقة .

3 - أنقل 1 سم3 من المزرعة السابقة الى دورق زراعة حجم 100 سم3 يحتوي على 50 سم3 من الوسط الغذائي السائل LB .

4 - أحضن المزرعة بدرجة حرارة 37.5 مْ في حاضنة هزازة بقوة هز 150 دورة في الدقيقة حتى وصول المزرعة الى كثافة ضوئية 0.5 ($O.D_{550} = 0.5$) عند طول موجي 550 أنكستروم .

ملاحظـــة :

يمكن معرفة وصول المزرعة الى الكثافة الضوئية المطلوبة وذلك بتحليل نموذج من المزرعة كل 15 دقيقة في جهاز قياس الكثافة الضوئية عند طول موجي 550 أنكستروم .

5 – بعد وصول المزرعة الى الكثافة الضوئية المطلوبة أحفظ دورق المزرعة في الثلج لمدة 15 دقيقة .

6 – أجمع بكتريا المزرعة بالطرد المركزي بقـــوة 2500 دورة في الدقيقة بدرجة حرارة 4 مْ .

7 – تخلص من الراشح وأعد اذابــة البكتريا بإضافة 20 سم3 من محلول 0.1 M Mgcl2 المثلج . أمزج البكتريا جيداً وأجمع نموذج البكتريا في أنبوبة واحدة نظيفة ومعقمة .

8 – أحفظ أنبوبة البكتريا في الثلج لمدة 5 دقائق .

9 – أطرد الانبوبة مركزياً بقوة 2500 دوره في الدقيقة لمدة 5 دقائق عند درجة حرارة 4مْ .

10 – تخلص من الراشح وأذب الراسب بإضافة 4سم3 من محلول 0.1 M Cacl2 المثلج وأحفظ أنبوبة البكتريا في الثلج لمدة 20 دقيقة .

11 – أطرد الانبوبة مركزياً كما في الخطوة 9 وتخلص من الراشح بعد ذلك .

12 – أذب راسب البكتريا بإضافة 2.5 سم3 من محلول 0.1 M Cacl2 المثلج ثم أحفظ الانبوبة في الثلج لمدة 24 ساعة .

13 – البكتريا في نهاية الخطوة 12 تكون مؤهلة Competent وقادرة على أستيعاب البلازميدات .

ثانياً : تحويل البكتريا المؤهلة Transformation of Competent bacteria :

(ادخال البلازميدات الى البكتريا المؤهلة E. coli HB 101)

1 - أنقل 1 سم3 من البكتريا المؤهلة E. coli HB 101 (الخطوة 12 من تأهيل البكتريا) الى أنبوبة نظيفة معقمة وأضف اليه 10 نانوجرام من محلول البلازميدات الهجينة (الخطوة 24 من بناء المكتبة) . أمزج جيداً وأحفظ الانبوبة في الثلج لمدة 30 دقيقة .

2 - أنقل أنبوبة خليط البكتريا + البلازميدات الهجينة بعد ذلك الى درجة حرارة 42 مْ لمدة دقيقتان ثم أنقلها مرة أخرى الى الثلج لمدة 10 دقائق .

3 - أضف 1 سم3 من الوسط الغذائي السائل الى أنبوبة البكتريا المحولة (الخطوة 2) أحضن بعد ذلك بدرجة حرارة 37.5 مْ لمدة ساعة واحدة .

4 - حضر تخافيف البكتريا 10^{-4} - 10^{-6} عن طريق أخذ 200 مايكروليتر من محلول البكتريا المحولة وتخفيفه بالوسط الغذائي السائل .

5 - خذ 200 مايكروليتر من كل تخفيف من تخافيف البكتريا السابقة وأمزج كل منها مع 3 سم3 من الوسط الغذائي LB نصف الصلب الدافىء + 150 مايكروجرام من المضادات الحياتية الامبسلين والتتراسايكلين Top agar . (حضر أنبوبتين لكل تخفيف للحصول على مجموعتي أنابيب) .

6 - صُبْ محتويات المجموعة الاولى من الأنابيب على سطح أوساط غذائية صلبة LB مقواة بالامبسلين فقط 50 مايكروجرام/سم3 . وأتركها لتتصلب .

7 - صُبْ محتويات المجموعة الثانية من الأنابيب على سطح أوساط غذائية صلبة LB مقواة بالتتراسايكلين فقط (50 مايكروجرام/سم3) وأتركها لتتصلب .

8 - أحضن مجموعتي الاطباق الغذائية بدرجة حرارة 37.5مْ لمدة 24 ساعة .

9 - أحسب كفاءة الكلونة والتحويل من خلال حساب عدد المستعمرات النامية على الوسط الغذائي الأول (المقوى بالامبسلين فقط) والوسط الغذائي المقوى بالتتراسايكلين فقط . آخذاً بنظر الاعتبار كمية البلازميد المستخدم وتخافيف البكتريا .

ملاحظـــة :

- البكتريا التي تنمو على الوسط الغذائي المقوى بالأمبسلين فقط هي البكتريا التي تحتوي على بلازميدات هجينة وغير هجينة بينما تكون البكتريا النامية على الوسط الغذائي المقوى بالتتراسايكلين ذات بلازميدات غير هجينة فقط .

- البكتريا ذات البلازميدات الهجينة النافعة في عمليات الهندسة الوراثية اللاحقة هي المستعمرات النامية على وسط مقوى بالامبسلين والتي لا تنمو على وسط مقوى بالتتراسايكلين . ويمكن معرفة هذه المستعمرات عن طريق نقل مستعمرات الوسط المقوى بالامبسلين الى ورقة ترشيح (أضغط ورقة الترشيح قليلاً على سطح الوسط الغذائي لهذا الهدف) ثم زراعة هذه المستعمرات على وسط غذائي مقوى بالتتراسايكلين بوضع ورقة الترشيح السابقة على سطح الوسط الغذائي بنفس ترتيبها على الوسط المقوى بالأمبسلين . أحضن الوسط الغذائي بدرجة حرارة 37.5 مْ لمدة 24 ساعة .

المستعمرات النامية على وسط التتراسايكلين هي المستعمرات التي فشلت في الحصول على بلازميدات هجينة بينما المستعمرات التي فشلت في النمو على وسط التتراسايكلين هي المستعمرات التي نجحت في الحصول على البلازميدات الهجينة .

الفصــل العاشـــر

قراءة تسلسل ترددات الـ DNA

DNA Sequencing

محاليـــل

1 – محلول داراىء للبادئة 5 x :

200	mM	Tris - Cl	
100	mM	$MgCl_2$	
250	mM	Nacl	PH = 7.4

2 – محلول التحميـــل :

%95		Formamide	
20	mM	EDTA	
% 0.1		Bromophenol blue	PH = 8.0
I%0.1		Xylene cyanol	

قراءة تسلسل ترددات الـ DNA حسب طريقة سانجر - كولسون

لأجل قـراءة تسلسل تردد DNA العـاثي M13 مثلاً فيجب توفر البادئة 5 - 3 - GTAAAACGACGGCCAGT لعمل ذلك .

جهز المحاليل التالية قبل بدء العمل مباشرة :

أ – محلول خليط النيوكليوتيدات : (محلول الخليط الموسم رقم 1) :

7.5	مايكروليتر	من محلول 100 uM dGTP, dTTP, dCTP
77.5	مايكروليتر	ماء مقطر معقم .

الآن :

خـذ 8 مايكروليتر من محلول خليط النيوكليوتيدات السابق تحضيره وأضف اليـه 32 مايكروليتر من الماء المقطر في أنبوبة للحصول على محلول خليط النيوكليوتيدات تركيز 1.5 uM (محلول الخليط رقم 2) . استعمل هذا الخليط في التفاعلات القادمة .

ب – محلول خليط النيوكليوتيدات الشبيهة الغالقة :

أربعة محاليل :

المحلول الأول : 50 mM Nacl, 80uM dGTP, 80uM dATP, 80uM dCTP, 80uM 80uM dTTp + 8 uM ddCTP .

المحلول الثاني : 50 mM Nacl, 80uM dGTP, 80uM dATP, 80 uM dTTP, 80 uM dCTP + 8 uM ddGTP,

المحلول الثلث : 50 mM Nacl, 80uM dGTP, 80uM dATP, 80 uM dTTP, 80uM dCTP + 8 uM ddTTP

المحلول الرابع : 50 mM Nacl, 80uM dGTP, 80uM dATP, 80uM dCTP, 80uM dTTP + 8 uM ddATP

1 - في أنبوبة تفاعل حضر ما يلي :

2 مايكروليتر بادئة 2.5 نانوجرام/مايكروليتر

2 مايكروليتر محلول دارىء للبادئة

6 مايكروليتر محلول DNA العائي M13 (تركيز 0.75 مايكروجرام) .

أحضن الانبوبة في حمام مائي بدرجة حرارة 55 مْ واترك الحمام المائي يبرد تدريجياً لدرجة حرارة الغرفة (حوالي ساعتين) .

2 - أضف الى أنبوبة التفاعل السابق ما يلي :

1 مايكروليتر محلول 0.1 M DTT

0.5 مايكروليتر $\propto$ - S^{35} dATP

2 مايكروليتر أنزيم Klenow fragments (20 وحدة) .

2 مايكروليتر محلول خليط النيوكليوتيدات رقم 2 .

أمزج التفاعل جيداً وأحضن بدرجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق .

3 - حضر أربعة أنابيب وأضف الى كل منها ما يلي :

الأنبوب ألأول : 2.5 مايكروليتر من محلول خليط النيوكليوتيدات الشبيهة الغالقة الاول + 3.5 مايكروليتر من محلول التفاعل السابق (الخطوة 2) .

الأنبوب الثاني : 2.5 مايكروليتر من محلول خليط النيوكليوتيدات الشبيهة الغالقة الثاني + 3.5 مايكروليتر من محلول التفاعل السابق (الخطوة 2) .

الأنبوب الثالث : 2.5 مايكروليتر من محلول خليط النيوكليوتيدات الشبيهة الغالقة الثالث + 3.5 مايكروليتر من محلول التفاعل السابق (الخطوة 2) .

الأنبوب الرابع : 2.5 مايكروليتر من محلول خليط النيوكليوتيدات الشبيهة الغالقة الرابع + 3.5 مايكروليتر من محلول التفاعل السابق (الخطوة 2) .

4 – أحضن الأنابيب الاربعة بدرجة حرارة 37.5 لمدة 5 دقائق .

5 – أضف الى كل أنبـوبة 4 مايكروليتر من محلول التحميل . أحفظ الأنابيب بدرجة حرارة – 70مْ حتى استخدامها في الهجرة الكهربائية .

6 – أحضن الأنابيب الاربعة بدرجة حرارة 95مْ لمدة دقيقتان .

7 – خــــذ 2 مايكروليتر من كل أنبوبة وضعها في حفرة خاصة في هلام الاكرليمايد 8% Denaturing Polyacrylamide + يوريا .

أعمل الهجرة الكهربائية بتيار كهربائي 50 وات لمدة ساعتين .

ملاحظـة :
انتبه لموقع كل تفاعل وأعمل اشارة خاصة لتعيين كل منهما بإستخدام الحفرة الاولى للتفاعل الاول والثانية للثاني وهكذا .

8 – أقفل التيار الكهربائي عن جهاز الهجرة الكهربائية ثم أرفع الهلام عن الجهاز عن طريق رفع حامل الهلام بحذر شديد .

9 – ضع تحت الهلام وفوقه قطعة من ورق الترشيح بنفس حجمه .

10 – أنقل الهلام الى جهاز الحرارة والشفط عند درجة حرارة 80مْ لمدة ساعتين .

11 – في غرفة مظلمة أنزع ورقة الترشيح العلوية من الهلام دون الاضرار بالهلام وغطي الهلام بفلم أشعة – x وأغلق كاسيت الفلم بعد ذلك بصورة جيدة .

12 – أحفظ الكاسيت بدرجة حرارة – 70مْ لمدة 36 ساعة .

13 – في غرفة مظلمة أفتح الكاسيت وعامل فلم أشعة – x بمحلول التظهيـر والتثبيت ثم جففه بالتعليق .

14 – اقرأ نتائج التجربة من النهاية الخامسة الى النهاية الثالثة اعتباراً من قعر الهلام .

المصـــــادر العـــــــربية

1 - الوراثـــة الجزيئية - د . عبد الحسين مويت الفيصل - جامعة التحدي/ليبيا 1998 .

2 - الهندسة الوراثية - د . عبد الحسين مويت الفيصل - دار الشروق للنشر والاعلان والتوزيع - عمان / الأردن 1999 .

3 - الخلية ، التركيب الدقيق والوظائف - د . عبد الحسين مويت الفيصل - الدار الاهلية للنشر والتوزيع - عمان / الاردن 1999 .

4 - الوراثة العامة - د . عبد الحسين مويت الفيصل - الدار الاهلية للنشر والتوزيع - عمان / الاردن 1999 .

5 - مدخل الى الوراثة الجزيئية - أحمد يوسف المتيني - منشأة المعارف - الاسكندرية - مصر - 1994 .

6 - مبادىء علم الوراثة - جاردنر وسنستاذ ترجمة د . أحمد شوقي وجماعته - الدار العربية للنشر والتوزيع - القاهرة - مصر - 1987 .

المصـــادر الأجنبيـــة

1 - Al-Faisal, A. H. M. 1999. Systemextic and evolutionary status analysis of the mussel species Mytilus edulis and M. galloprvincialis by genomicblot hybridization. 1st conference in medical and biological Science - Zarka Private University, 24 - 25 April 1999 Jordan.

2 - Al-Faisal. A. H. M. and J. Parry. 1998 - Detection of abnormal allele of N-ras proto-oncogene in SHE cells induced by B (a) P.
Cancer Molecular Biology 5 (3) :

3 - Al-Faisal. A. H. M. and J. Parry. 1998. Abnormal chromosome location of K-ras and H-ras proto-oncogenes in SHE cells treated with a single exposure to B (a) p. Cander Molecular Biology 5 (3) :

4 - Al-Faisal, A. H. M. 1998. Effect of DNA concentration and plasmid size on the transformation of the bacteria Staphylococcus aureus. Al-Tahadi University Scientific Journal 2 : 29 - 35.

5 - Al-Faisal, A. H. M. 1998. Effect of plasmid size on the transformation efficiency of the bacteria E. coli. 1st conference of the Biology Science. Bengazi - Liyba - 6 - 8 May 1998.

6 - Al- Faisal, A. H. M. 1990. Studies on the molecular analysis of eukaryotic DNA Ph.D. thesis - University of Wals - U. K.

7 - Brown, T. A. 1986. Gene cloning, an introduction. Van Nostrand Reinhold - U. K.

8 - Clarke. L. and J. Carbon, 1976. A colony bank containing synthetic Col E. hybrid plasmids representative of the entire E. coli genome. Cell 9 : 91 - 99.

9 - Cohen. S. N. 1975. The manipulation of genes. Sci. Amer. 233 : 24 - 33.

10 - Davis, L. G., Kuch. W. M. and J. F. Battey. 1997. Basic methods in molecular biology. 2nd ed. - Appleton and lange - USA.

11 - Dressler, D. and H. Potter. 1982. Molecular mechanisms in genetic recombinant. Ann. Rev. Biochem. 51 : 727 - 761.

12 - Grunstein, M. and D. S. Hogness. 1975. Colony hybridization : A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. Proc. Natl. Acad. Sci. 72:3961 - 3962.

13 - Maniatis. T., E. F. Fritsch and J. Sambrook. 1982. Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harber - New York - USA.

التقنيات المعملية في الهندسة الوراثية

تمثل تقنيات الهندسة الوراثية أحد أهم المرتكزات العلمية التي توصل اليها العلماء خلال القرن العشرين وأعتبرها البعض بمثابة ثورة توازي في ضخامتها وأهميتها العلمية الثورة التي أحدثها الكومبيوتر وبرامجياته. وسنلاحظ من خلال هذا الكتاب أن هذه التقنيات العظيمة أتحدت سوية في بعض الطرق المستخدمة هنا ليتحقق منها فائدة ضخمة ساهمت كثيراً في أختصار العديد من خطوات عمل هذه التقنيات.

غطى الكتاب بفصوله العشرة معظم آليات وتقنيات العمل اللازمة في الهندسة الوراثية والوراثة الجزيئية مع ملاحظات لتفسير أو توضيح العديد من خطوات العمل لجعل هذه التقنيات واضحة وبسيطة ومناسبة للعمل المختبري للطلبه الجامعيين والباحثين.

الناشر



المملكة الأردنية الهاشمية - عمان / وسط البلد
خلف مطعم القدس / ص.ب ٧٧٧٢ - هاتف ٤٦٣٨٦٨٨
فاكس ٤٦٥٧٤٤٥ ◆ منشورات في العام ١٩٩٩ م
◆ الغلاف: زهير أبو شايب.